SÉRIE A, N° 4392
N° D'ORDRE : 5241

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

CLAUS HETZER

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'HYDROLYSE DES PHOSPHATES CYCLIQUES HEXAATOMIQUES

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

PHOSPHATASES ET PHOSPHODIESTÉRASES

Soutenues, le 12 décembre 1964, devant la Commission d'examen

Jury { M. LEDERER — *Président.*
Mlle QUINTIN
M. VILKAS } *Examinateurs.*

FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du candidat : HETZER.

Prénom : Claus.

Date de la soutenance : 12 décembre 1964.

Numéro d'ordre : Série A 4392. N° 5241.

HETZER (Claus). — Contribution à l'étude du mécanisme de l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques. — Paris, Imprimerie du Ministère de l'Air, 1966. In-8°, 94 p., 21 fig.

(Th. Sc. Phys., Paris, 1966. Série A 4392. N° 5241)

HETZER (Claus). — Contribution à l'étude du mécanisme de l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques. — Paris, Imprimerie du Ministère de l'Air, 1966. In-8°, 94 p., 21 fig.

(Th. Sc. Phys., Paris, 1966. Série A 4392. N° 5241)

HETZER (Claus). — Contribution à l'étude du mécanisme de l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques. — Paris, Imprimerie du Ministère de l'Air, 1966. In-8°, 94 p., 21 fig.

(Th. Sc. Phys., Paris, 1966. Série A 4392. N° 5241)

SÉRIE A, N° 4392
N° D'ORDRE : 5241

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

CLAUS HETZER

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'HYDROLYSE DES PHOSPHATES CYCLIQUES HEXAATOMIQUES

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

PHOSPHATASES ET PHOSPHODIESTÉRASES

Soutenues, le 12 décembre 1964, devant la Commission d'examen

Jury { M. LEDERER — *Président.*
Mlle QUINTIN
M. VILKAS } *Examinateurs.*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE L'HYDROLYSE DES PHOSPHATES CYCLIQUES HEXAATOMIQUES

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen . . . . . M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART.....	T	Minéralog. et cristal.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT ...	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
M^lle^ COUSIN ...	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI.....	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et sédimentologie (Orsay).
GAUTHERET ...	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.....	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND.....	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER.....	T	Mécanique exp. des fluides.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC ..	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
M^lle^ CAUCHOIS .	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HÉRITIER ...	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET.....	T	Radio-électricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ..	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallog.
J.-P. MATHIEU .	T	Physique (optique).
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER.....	T	Physique des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD.....	T	Aviation (tech. aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral.
NORMANT.....	T	Synthèse organique.
BÉNARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC.....	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie vég. appliquée.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appl.
KIRRMANN.....	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD....	T	Botanique.
M^lle^ LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et histol. comparée.
EHRESMANN ...	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD ...	T	Géographie phys. et géologie.
GODEMENT	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Tech. math. de la phys.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN ...	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M^me^ TONNELAT.	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechnique générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).

Mme Chaix	T	Chimie biologique.
Mme Hurel-Py.	T	Biologie végétale (P.C.B.).
Piaux	T	Chimie (M.P.C.).
Brun	T	Mécanique théorique des fluides.
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil ..	T	Mathématiques (Agrég.).
Mme Lelong ..	T	Mathématiques II (E.N.S.).
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.).
Cotte.....	T	Physique électricité.
Dubois J.-E. ..	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.).
Michel A.	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Énergétique générale.
Rouault	T	Électricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz ..	T	Chimie physique.
Brossel.....	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie vég. (Orsay).
Castaing	T	Physique II thermo. (Orsay).
Curien	T	Minéralogie et cristallog.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Noirot	T	Évolution des êtres org.
Pannetier	T	Chimie générale.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann.....	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucl. et radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Biol. physico-chim. (Orsay).
Villé	T	Économétrie.
Willemart ...	T	Chimie (P.C.B.).
Dodé	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet ...	T	Biol. vég. (S.P.C.N.) (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien ...	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley ...	T	Géométrie algéb. et théorie des groupes.
Arnoult	T	Électronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques génér. (Orsay).
Germain	T	Mécanique théor. des fluides.
Lucas G.	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot ...	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).
Bricard	T	Météor. et physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard..	T	Psycho-physiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
M. Julia	T	Études des moléculaires complexes.
Lender	T	Biol. anim. (S.P.C.N.) (Orsay).
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin ..	T	Électrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit.....	T	Physiol. animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Écologie végétale (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay).
Chatelet M. ..	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucl. (Orsay).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard ...	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Électronique (Orsay).
Bouissières ..	T	Radiochimie.
Mme Couture..	T	Thermo. et méc. physique.
Ellenberger..	T	Géologie des grandes régions du globe.
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.).
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski ...	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin		Biologie animale (P.C.B.).
Beaumont.....		Biologie animale (S.P.C.N.).
Blamont	T	Géophysique-ionosphère.
Bourreau	T	Botanique.
Curie D.....		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan.....	T	Physique (S.P.C.N.).
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliq. à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
Mlle Fourcroy.		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat..	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle Veil.....	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck....	T	Mécan. phys. et expér.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard	T	Physique (P.C.B.) (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur.....	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie phys. et géol. dynamique.
Comolet	T	Mécanique des fluides.
Corabœuf.....	T	Physiol. animale (Orsay).
Delloue		Physique de l'exosphère.
Gorenflot ...		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale (P.C.B.).
Jullien J.		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
Malgrange ...	T	Technique math. de la physique (Orsay).
Olivier		Antropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
Chevaugeon ..	T	Botanique (Orsay).
Kahane.....	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques fém. (E.N.S.)
Kourganoff ..	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abelès		Physique (S.P.C.N.).

Amat	T	Physique (P.C.B.).
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal ..	T	Phys. nucléaire et radio-activité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.).
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal	T	Physique (M.G.P.) (Orsay).
Deheuvels ...	T	Mathématique propé.
D'Espagnat ..	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Genevès		Biologie végétale (P.C.B.).
Guilbert		Physique (C.U.S.) (Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande.....	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie (P.C.B.).
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Méc. théor. des fluides.
Roubine	T	Électronique.
Silber	T	Chimie (P.C.B.).
Uebersfeld ..	T	Électronique.
Yvon	T	Théories physiques.
Hervé	T	Mathématiques.
Néron	T	Mathém. (M.P.C.) (Orsay).
Mme Pecker-Wimel..	T	Astrophysique.
Balkansky ...		Physique (M.P.C.).
Le Corre	T	Électricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Phys. théor. des hautes énergies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. exp. des hautes énergies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radio-activité (Orsay).
Échalier		Biologie animale (P.C.B.).
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. (Orsay).
Dars		Géologie struct. et géol. appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky .	T	Mécanique industrielle.
Blaquière		Électronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.U.S.) (Orléans).
Malliavin	T	Mathématique propé. (Orsay).
Gaudemar		Chimie propédeutique.
Pérez y Jorba .		Phys. exp. des hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (agrég.) (Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.

Secrétaire général . . . . . R. Poullain

Cette Thèse a pu être menée à bien grâce à une bourse, renouvelée plusieurs fois, que m'avait accordée la Commission des Bourses de l'Organisation du Traité de l'Atlantique Nord :

Qu'il me soit permis d'adresser à cette Commission, à travers la personne de son président, M. le Professeur L. Ragey, *l'expression de ma profonde reconnaissance pour sa généreuse confiance.*

Mlle le Professeur Marguerite Quintin *m'a suggéré les expériences faisant usage de l'oxyde de deutérium ainsi que les mesures électrochimiques: je tiens à lui exprimer ma respectueuse gratitude pour l'aide et l'accueil qu'elle a bien voulu m'accorder.*

M. L. Szabo, *Maître de Recherches au C.N.R.S., m'a fourni le sujet de ma Thèse et n'a cessé de me guider tout au long de ce travail: qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.*

Les spectres infrarouges ont été enregistrés dans les Laboratoires de M. le Professeur J. P. Mathieu *et de* Mme Andrée Mathieu, *et les spectres RMN, dans celui de* M. le Professeur R. Freyman*: je les remercie très sincèrement pour toute l'aide qu'ils ont bien voulu m'accorder.*

Je tiens à exprimer ma particulière reconnaissance à M. Guérin de Montgareuil, *du Commissariat de l'Énergie Atomique, Cadarache, et à* Mme Ita Wassermann, *du Weizmann Institute of Science, qui ont fait les recherches d'abondance isotopique: sans leur aide constante ce travail n'aurait pu être effectué.*

SOMMAIRE

Le comportement des phosphates cycliques pentaatomiques a été étudié par plusieurs auteurs; nous nous sommes donc efforcé d'analyser le mécanisme de l'hydrolyse alcaline des phosphates cycliques hexaatomiques. Nous avons examiné l'hydrolyse du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate, du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate et du butanediol-1,3-phosphate. De ce dernier composé, qui est le représentant le plus simple des phosphates cycliques hexaatomiques dans lesquels le radical phosphoryle relie un alcool primaire et un alcool secondaire, nous avons élaboré une synthèse.

Nous avons utilisé comme traceur l'isotope ^{18}O sous forme d'eau et nous avons prouvé, en isolant et analysant la partie glucidique aussi bien que le résidu phosphorique des molécules, qu'en présence de baryte l'hydrolyse des phosphates cycliques mentionnés se fait uniquement par rupture de la liaison P-O, alors que l'hydrolyse des phosphodiesters acycliques s'effectue principalement par une rupture des liaisons C-O. En revanche, en présence de soude, l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques ne procède plus exclusivement par rupture des liaisons P-O : la rupture des liaisons C-O a également lieu.

Une étude cinétique de la réaction d'hydrolyse en présence d'ions baryum, sodium, potassium et lithium nous a indiqué que l'hydrolyse des phosphates cycliques suivait une réaction de deuxième ordre, sa vitesse étant environ trente-cinq fois plus grande en présence de baryum qu'en présence d'ions monovalents. A la suite de cette observation nous avons mesuré les changements de conductivité des solutions contenant les phosphates cycliques hexaatomiques et les cations dont l'hydroxyde a été utilisé pour l'hydrolyse. Par cette méthode nous avons pu démontrer que l'ion baryum, comme d'ailleurs les ions magnésium et calcium, forment des complexes avec les phosphates cycliques hexaatomiques à pH 7 aussi bien qu'à pH alcalin, alors qu'aucune formation de complexe n'a pu être mise en évidence pour les ions sodium, potassium et lithium.

Les spectres d'absorption infrarouge des groupes P-O en présence, et en l'absence de différents ions, et, en particulier, les changements de fréquence et les variations d'intensité de ces vibrations observés dans l'eau lourde (D_2O), nous ont amené à postuler pour le complexe que forment les phosphates cycliques hexaatomiques avec l'ion baryum, l'inclusion d'une molécule d'eau. Dans le complexe ainsi formé l'atome de phosphore est porteur d'une charge positive et de ce fait devient l'objet d'une attaque nucléophile de l'ion hydroxyle. A la suite de considérations théoriques, nous postulons pour l'état

de transition, par lequel se fait l'hydrolyse, un atome de phosphore pentacovalent (sp^3d), la forme géométrique du complexe étant une pyramide carrée, imposée, d'une part, par le cycle phosphorique hexaatomique et, d'autre part, par la coplanarité du complexe que forment les deux oxygènes du radical phosphoryle avec la molécule d'eau et l'ion baryum. Cette même forme géométrique, qui facilite l'attaque sur l'atome de phosphore, n'est pas imposée aux phosphodiesters acycliques, ce qui permet d'expliquer leur comportement différent pendant l'hydrolyse.

Le mécanisme que nous proposons donne également une interprétation satisfaisante de l'hydrolyse de l'acide ribonucléique et de l'hydrolyse de l'acide désoxyribonucléique en présence d'ions baryum, lanthane et cérium.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

1 **Hydrolyse des esters phosphoriques** 3

1,1 Aperçu bibliographique sur les esters phosphoriques 3

1,11 Phosphates simples 3

1,12 Phosphates cycliques 10

1,2 Hydrolyses du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate, du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate et du butanediol-1,3-phosphate 14

1,21 Hydrolyses par la baryte 20

1,22 Contrôle de la réaction d'incorporation 22

1,23 Hydrolyses par la soude et la potasse 23

1,3 Échange isotopique sur membrane 24

2 **Mécanisme de l'hydrolyse alcaline des phosphates cycliques hexaatomiques** 28

2,1 Effets ioniques 28

2,2 Détermination de la vitesse d'hydrolyse de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate (méthode chimique) 31

2,3 Détermination de la vitesse d'hydrolyse du 2,3-di-O-benzyl-α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate (méthode physique) 33

2,4-*a*) Effets de dissociation 34

2,4-*b*) Effets de complexation 38

1° Mesures conductimétriques 38

2° Mesures d'absorption IR 45

2,5 Conclusions sur l'effet ionique 52

3 **Discussion des résultats obtenus. Proposition d'un mécanisme de réaction** 54

DEUXIÈME PARTIE

1 **Partie expérimentale** 65

1,1 Méthodes générales 65

1,2 Hydrolyses des phosphates cycliques par la baryte 69

PAGES

1,3 Échange isotopique sur membrane 73

1,4 Hydrolyses des phosphates cycliques par la soude 74

1,5 Contrôle de la réaction d'incorporation 75

1,6 Détermination de la vitesse d'hydrolyse de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate par dosage du phosphate cyclique non hydrolysé 76

1,7 Synthèse du butanediol-1,3-phosphate 78

1,8 Mesures conductimétriques sur la complexation des phosphates cycliques... 80

1,9 Détermination de la vitesse d'hydrolyse d'un phosphate cyclique par la méthode conductimétrique 87

Bibliographie 89

INTRODUCTION

Les phosphodiesters cycliques pentaatomiques ont fait récemment l'objet d'études plus détaillées, qui ont élucidé en grande partie le comportement de ces corps lors de l'hydrolyse alcaline et acide et qui ont établi surtout le point de rupture du cycle lors de ces hydrolyses.

Il existe aussi un très grand nombre de phosphodiesters cycliques hexaatomiques, à l'un desquels avait été reconnue, il y a peu de temps, une importance biochimique, l'adénosine-3′, 5′-phosphate. Lors des dégradations chimiques et biochimiques de certains phosphates organiques, on passe assez souvent par le stade de phosphate cyclique, bien qu'il s'agisse dans la plupart des cas, de cycles pentaatomiques, les hexaatomiques étant plus stables, et se formant dans des cas où, pour des raisons énergétiques, stériques ou autres, la formation de cycles pentaatomiques n'est pas possible.

Dans notre laboratoire, on avait fait précédemment des essais sur l'hydrolyse des phosphates cycliques et une étude plus approfondie s'imposait si l'on voulait essayer d'établir le mécanisme intime de la réaction. La question qui se posait surtout était celle de savoir si l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques suivait un mécanisme analogue à celui des phosphates pentaatomiques ou si, dans leurs réactions, ils s'approchaient plutôt des diesters phosphoriques acycliques. Les premiers réagissent, en milieu alcalin, uniquement par rupture P-O, tandis que les derniers se scindent par deux mécanismes différents : rupture C-O *et* rupture P-O, le premier l'emportant à environ 80 % (pour le diméthylphosphate), mais le taux en varie selon le cation présent dans le milieu réactionnel.

Il est également très intéressant de constater que pour l'hydrolyse d'un diester cyclique hexaatomique, reliant un groupe alcool primaire et un groupe alcool secondaire, la rupture du cycle, qui peut se faire aussi bien entre C et O ou P et O de l'alcool primaire qu'entre C et O ou P et O de l'alcool secondaire, on obtient les deux monophosphates théoriquement possibles : leur rapport dépend en grande partie de la composition du reste de la molécule.

Un phénomène surprenant et intimement lié au mécanisme de réaction de l'hydrolyse des esters phosphoriques en général, s'observe dans l'influence des cations sur la vitesse et le résultat de l'hydrolyse. Autant de facteurs qui nous ont intéressé et incité à étudier d'une manière plus détaillée le comportement des diesters phosphoriques hexaatomiques pendant leur hydrolyse.

Avant de nous approcher du problème proprement dit du mécanisme de la réaction de ces diesters lors de leur hydrolyse et de l'influence exercée par des différents cations sur cette réaction, il nous a semblé indispensable de connaître la réactivité générale des esters phosphoriques. Nous serons d'ailleurs obligé d'introduire plus tard quelques notions sur la physico-chimie du phosphore pour pouvoir expliquer sa façon de réagir.

Nous nous bornerons uniquement à l'étude de l'hydrolyse *alcaline* de nos esters cycliques pour des raisons qui ressortiront de la littérature que nous passerons en revue. Nous essaierons de mettre en relation certaines des observations que nous avons faites sur nos diesters cycliques et les résultats obtenus par d'autres auteurs sur le RNA et le DNA en solution alcaline.

PREMIÈRE PARTIE

1 HYDROLYSE DES ESTERS PHOSPHORIQUES

1,1 APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ESTERS PHOSPHORIQUES

1,11 Phosphates simples.

Un monoester phosphorique simple peut réagir selon seize réactions différentes, selon qu'il y a une attaque nucléophile sur le carbone ou le phosphore de la liaison C — O — P, selon que la réaction est uni- ou bimoléculaire et surtout selon la forme sous laquelle la molécule réagit : le dianion, le monoanion, la forme neutre ou un des acides conjugués. En principe, il devrait être relativement facile de déterminer cette forme, en employant des données électro-chimiques; en pratique ces données seront difficiles à obtenir et il est difficile aussi de déterminer la molécularité de la réaction par un critère simple, parce que, dans beaucoup de réactions, on n'en peut pas identifier avec certitude le nucléophile.

Les esters phosphoriques sont connus depuis plus d'un siècle. Berthelot a effectué la première phosphorylation du glucose par de l'acide phosphorique sirupeux en 1858 [1]. Les premiers essais d'hydrolyse d'esters phosphoriques semblent avoir été faits par Cavalier [2] à la fin du siècle dernier. Cet auteur constate déjà que « la baryte décompose l'éther neutre $PO_4(C_2H_5)_3$ plus vite que l'eau ». Lossen et Kohler [3] montrent que, lors de l'hydrolyse barytique de l'éthyl-diméthylphosphate, le radical méthyle part six fois plus vite que le groupe éthyle. En 1911, Malengreau et Prigent [4] décrivent leurs résultats, selon lesquels les glycérophosphates sont hydrolysés plus rapidement par certains acides faibles que par d'autres acides plus forts.

Les premiers essais sur la cinétique de l'hydrolyse des monoesters ont été faits, à notre connaissance, par M. C. Bailly [5] et par Desjobert [6] [7]. Mlle Bailly a travaillé sur l'hydrolyse et la transposition (sur laquelle nous reviendrons plus loin) des monoesters du glycérol et a trouvé un maximum de la vitesse d'hydrolyse vers pH = 3 et un minimum à pH = 0,2-0,6. Desjobert, qui travaillait sur l'éthylphosphate, a trouvé la même forte dépendance du pH, avec un maximum à pH = 4, un minimum à pH = 1 et une réaction nulle vers pH = 8. L'hydrolyse en milieu acide n'est donc qu'une solvolyse du monoanion dans l'eau qui passe, comme le taux des monoanions, par un maximum pour pH = 4. Aux pH plus élevés, il intervient la deuxième dissociation du phosphate et l'hydrolyse s'arrête, le nucléophile ne pouvant plus s'approcher à cause de la forte charge négative du dianion. La vitesse d'hydrolyse décroît aussi

vers les pH plus acides, passe par un minimum qui correspond à l'hydrolyse de la forme neutre de l'ester phosphorique et augmente pour un pH plus petit (catalyse protonique).

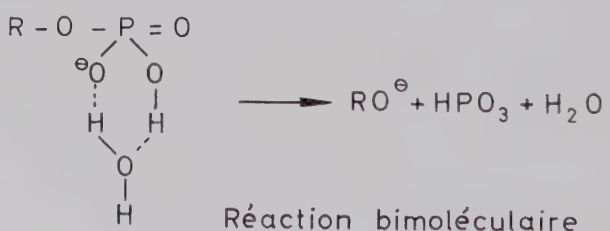
Le même profil pour la courbe d'hydrolyse en fonction du pH du 2-méthoxy-1-méthyl-éthylphosphate a été obtenu par Butcher et Westheimer [8]. A pH = 4, l'alcool obtenu par cette hydrolyse avait conservé son activité optique, démontrant ainsi qu'une scission P-O avait lieu, ce qui a été confirmé par une hydrolyse dans de l'eau enrichie en ^{18}O. Oldham (dans [9], p. 19) a montré qu'au même pH l'hydrolyse du méthylphosphate se faisait aussi par scission P-O, puisqu'il avait isolé du méthanol qui ne contenait pas d'isotope lourd lors de l'hydrolyse effectuée avec de l'eau marquée en ^{18}O. Des résultats semblables ont été obtenus pour d'autres monoesters et l'on peut dire qu'en général l'hydrolyse du *monoanion* se fait par scission P-O. Pour l'hydrolyse de *l'acide conjugué* on a observé des scissions C-O et P-O ainsi que les deux simultanément. Pour la *forme neutre* de l'ester le lieu de la scission n'a pas encore pu être mis en évidence.

Les vitesses de réaction pour les différentes espèces sont, selon Vernon et al. [10] les suivantes :

ESPÈCE RÉAGISSANTE	COEFFICIENT VIT. SPÉC. × 10^6 (100°)	MOLÉCULARITÉ
Monoanion	8,23	2
Neutre	0,50	2
Conjugué (C-O)	2,00	2
Conjugué (P-O)	1,08	2

Les mêmes auteurs ont d'ailleurs observé un échange isotopique d'oxygène entre le méthylphosphate et le solvant (eau) en milieu fortement acide.

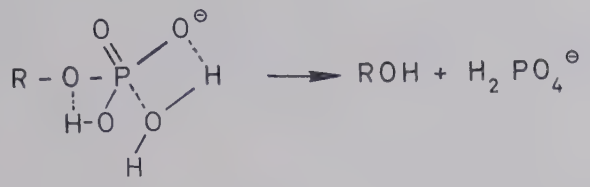
Pour expliquer le mécanisme de l'hydrolyse des monoesters phosphoriques en milieu acide ou neutre, on peut invoquer une attaque par le solvant ou une hétérolyse lente passant par le métaphosphate, celle-ci pouvant passer par un état de transition à quatre centres [8] [9] :



Réaction bimoléculaire

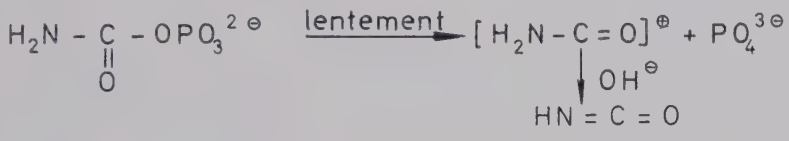
Hétérolyse

même réaction avec intervention directe d'eau :

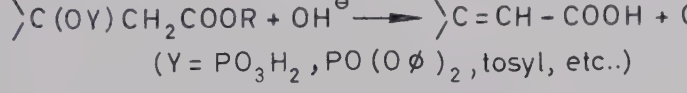


Nous avons d'ailleurs pu, comme nous verrons plus loin, rendre cette dernière réaction très vraisemblable par nos mesures d'absorption en IR.

En milieu alcalin les monoesters sont censés être stables à cause de la répulsion électrostatique entre l'ion $OH^{\ominus}$ et la double charge négative du monoester. Plusieurs observations faites pendant ces dernières années indiquaient cependant qu'il existait des monoesters phosphoriques labiles en milieu alcalin, dont beaucoup ont un grand intérêt biologique. C'est Lipmann [11] qui, pour la première fois, a postulé clairement un mécanisme de β-élimination pour la décomposition du carbamoyle-phosphate en solution aqueuse à pH > 6, où il se forme de l'isocyanate :



Ce genre de réaction est déjà bien connu pour les esters β-acyloxy (Linstead, Owens et Webb [12]) :



où le rapport élimination /hydrolyse augmente avec la force de l'acide YOH et la possibilité de conjugaison du produit non-saturé. La classification en trois catégories principales E_1, E_2 et E_{1cB} des mécanismes d'élimination pour les halogénures d'alkyle par Ingold [13] et Hughes a été employée pour les esters phosphoriques par Lapidot, Samuel et Silver [14] qui, ainsi que le groupe de Cherbuliez à Genève [15], [16] ont étudié de près ce mode de réaction, dont un excellent aperçu est donné par Bunnett [17]. La dégradation alcaline de la phosphosérine, du β-cyanoéthylphosphate, de l'adénosine-dialdéhyde-phosphate [18], du glucose-3-phosphate [19], du glycéraldéhyde-3-phosphate [20], du carbamoyle-phosphate (dianion) et du carbamoyle-phosphate (base conjuguée) [21] se fait par ce mécanisme.

Sur le mécanisme d'hydrolyse des diesters de l'acide phosphorique les données sont encore plus éparses que sur les monoesters. Plimmer et Burch [22] ont été les premiers à étudier l'hydrolyse des dialkylphosphates en milieu basique. Seuls le diméthylphos-

phate et le dibenzylphosphate [23], [24] ont fait l'objet d'études plus détaillées, ce dernier s'hydrolysant plus facilement que la plupart des autres diesters. En général les monoanions des diesters sont plus stables que ceux des monoesters et ne sont hydrolysés que très lentement en l'absence d'ions de métaux lourds.

Les triesters simples sont relativement stables. Ils s'hydrolysent plus vite en milieu alcalin, plus lentement sous forme « neutre » en dessous de pH = 7 et, selon Vernon [9], pas du tout par catalyse acide.

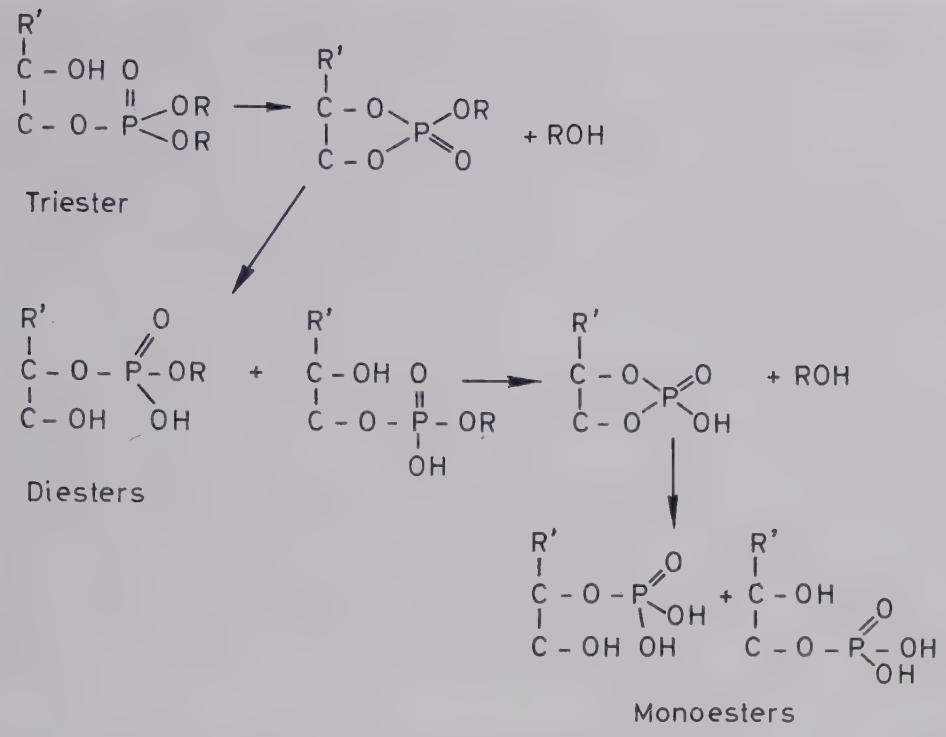
Les premiers qui aient étudié le mécanisme de l'hydrolyse des triesters phosphoriques ont été Blumenthal et Herbert [25]. Ils ont hydrolysé le triméthylphosphate en présence d'un excès de soude, d'un excès de HCl ou dans des conditions d'autohydrolyse. En milieu alcalin, l'hydrolyse se fait par rupture P-O, en milieu neutre ou acide, surtout par rupture C-O. Les triphényl- ou tri-*p*-nitrophénylphosphates [9] sont hydrolysés plus rapidement que le triméthylphosphate. Selon Plimmer et Burch [22] on peut même enlever les trois radicaux phényles en solution fortement alcaline, mais le premier part beaucoup plus vite que les deux autres. La résistance des triesters aliphatiques à l'hydrolyse augmente avec l'augmentation de la taille des radicaux [26]. Des solvants de constante diélectrique grande augmentent la vitesse d'hydrolyse de la forme neutre du triéthylphosphate et il y a un grand effet de sel positif, ce qui prouve que l'état de transition de la réaction doit avoir un caractère polaire considérable. Il semble aussi qu'une estérification croissante augmente la vitesse de réaction des formes neutres dans la série mono-, di- et triméthylester. On pourrait postuler que la dégradation relativement rapide des trialcoylphosphates, comparée à celle des di- et monoalcoylphosphates, est due à ce que les trois liaisons covalentes vers le groupe PO_4 diminuent sensiblement la résonance des liaisons π entre les quatre liaisons P-O (« anti-branching rule » de Van Wazer et Holst [27], sur laquelle nous reviendrons plus loin).

Les triesters simples de l'acide phosphorique ont un grand intérêt : on sait qu'il existe un enzyme, la paraoxonase, isolée à partir de sérum de mouton, qui est capable d'hydrolyser le diéthyl-*p*-nitrophénylphosphate (paraoxon) en diéthylphosphate et *p*-nitrophénol [28], [29]. On sait également que des phosphotriesters, contenant des groupes o-crésyl, ont des effets neurotoxiques, effets probablement dus à leur conversion, *in vivo*, en produits toxiques [30], [31], [32].

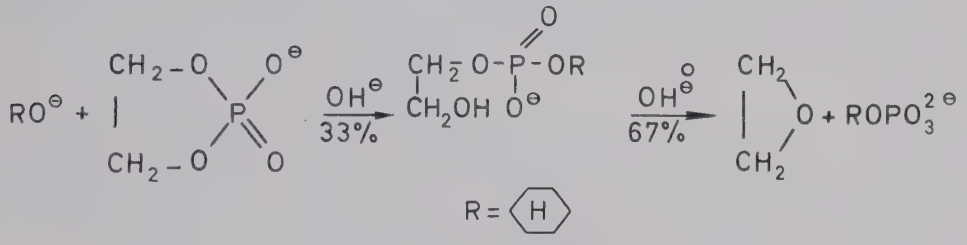
Effets de substituants fonctionnels sur l'hydrolyse des esters phosphoriques simples.

La présence de groupements fonctionnels dans la molécule, dans le voisinage immédiat du groupe phosphate, peut changer radicalement le cours de l'hydrolyse. Le premier à observer et à étudier l'effet d'un hydroxyle avoisinant, comme facteur d'instabilité des diesters phosphoriques, a été Fonó, dès 1947 [33].

Le groupe OH voisin augmente la vitesse de l'hydrolyse acide et alcaline des monoesters, des diesters (Brown et Usher [34]), et des triesters, qui passent dans la plupart des cas par des intermédiaires cycliques :

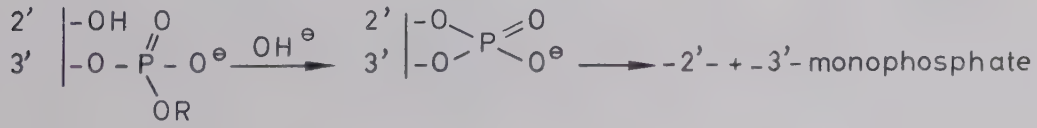


Les diesters peuvent aussi former des éthylène-oxydes, comme l'ont également montré Brown et al. [34], [35] :



Les triesters neutres s'hydrolysent aussi par l'intermédiaire d'un cycle hexaatomique, comme le montre l'exemple du 1,2-isopropylidène-xylofuranose-5-(diphényl phosphate), qui s'hydrolyse à travers le 3,5-(phényl phosphate) correspondant, pour donner le 3,5-phosphate, où le cycle reste intact, ce qui est un exemple de la stabilité relative des esters hexaatomiques.

Lors de l'hydrolyse acide de diesters phosphoriques ayant un groupe OH voisin, peut intervenir le phénomène de migration du groupe phosphoryle [36], [37], [38], [39], phénomène qui a été étudié par M. C. Bailly sur les *mono*esters phosphoriques du glycérol [5]. Brown et Higson [40] ont prouvé que la migration du groupe alcoyl-phosphoryle est également possible en milieu *acide*, alors qu'en milieu *alcalin* il n'y a pas de migration alcoyl-phosphate :

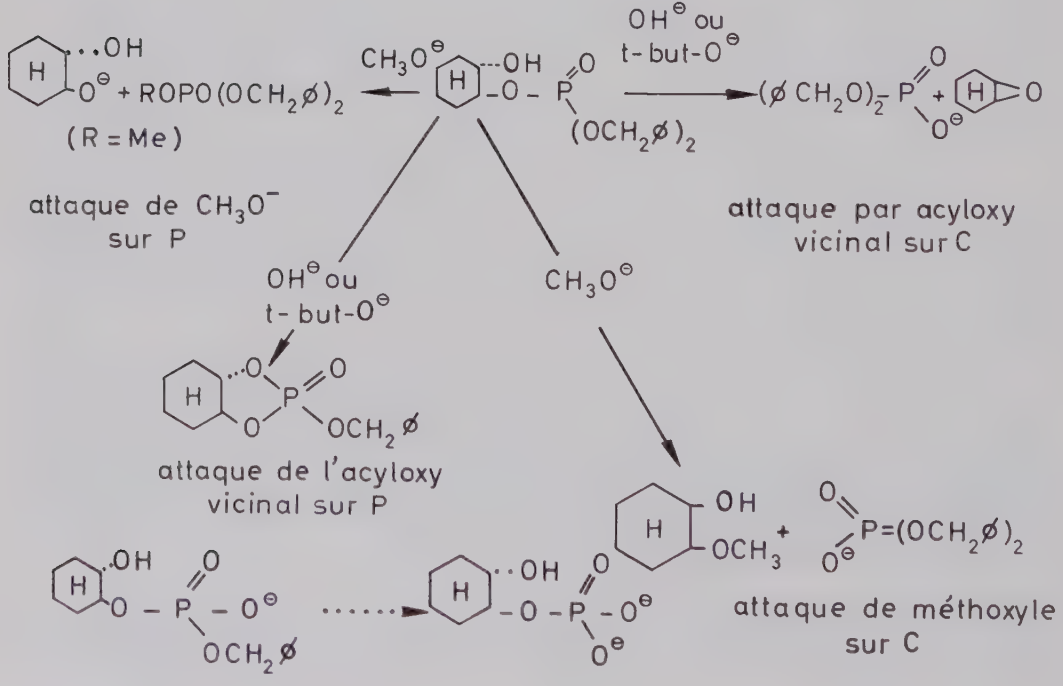


Cette réaction se fait peut-être déjà par un état de transition pentavalent et Todd et al. [41] se demandent même si ce sont les phosphates cycliques qui sont les intermédiaires pour ce genre de réactions.

Lors de l'hydrolyse alcaline de l'α- et du β-méthylglycérophosphate O. Bailly et Gaumé [42] ont toujours trouvé un mélange des α- et β-glycérophosphates. Cette isomérisation de l'α et du β est à rapprocher de celle, découverte par E. Fischer ([43], mémoire posthume), du groupe acyle dans les 1,3-diacyle-glycéroiodohydrines, laquelle a lieu lors du remplacement de l'iode par OH, donnant non pas les 1,3- mais les 1,2-diacyle-glycérides.

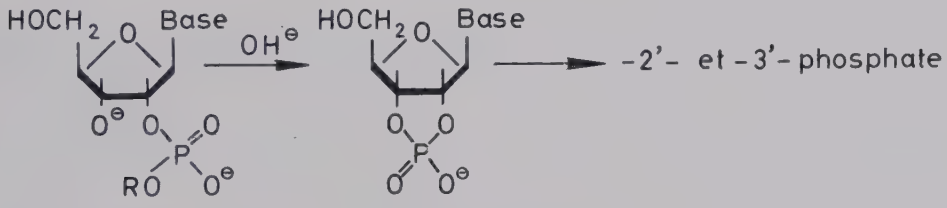
L'hydrolyse des phosphates comportant un OH voisin peut se faire si ces groupes OH se trouvent fixés sur une chaîne ouverte, sur un cycle en position trans ou cis, celle en cis étant favorisée, comme l'ont montré les études de Brown et al. [40], [44], [45], [46]. Ainsi, lors de l'hydrolyse des cyclohexanediol-benzylphosphates les cis- et trans-1,2-cyclohexanediolphosphates sont des intermédiaires hydrolysés facilement, tandis que les cis-1,3-cyclohexanediolphosphates sont très stables, puisqu'ils ne sont pas attaqués par la soude à 30 % à 100° et le sont très lentement seulement par l'acide chlorhydrique 3 N. La forme trans du 1,3-phosphate est attaquée deux fois plus vite, ceci étant dû à la tension intérieure plus grande du cycle (pour les 1,2-phosphates la forme cis s'hydrolyse plus vite que la forme trans).

En 1960, Brown et Hamer ont trouvé [35] que lors de la solvolyse alcaline du dibenzyl-*trans*-2-hydroxy-cyclohexylphosphate celle-ci peut avoir lieu selon trois mécalismes différents qui dépendent essentiellement de la stéréochimie du groupe acyloxy vicinal et de l'espèce nucléophile attaquante :



Beaucoup d'autres auteurs se sont intéressés au mécanisme d'hydrolyse des diesters phosphoriques comportant un groupe OH vicinal, ceci surtout parce que ces substances sont d'un grand intérêt biochimique. Parmi ceux-ci citons : Fleury et Lecocq [47] qui ont fait une nouvelle étude de l'hydrolyse alcaline des esters monométhyliques des α- et β-glycérophosphates, Long et Maguire [48] qui se sont occupés de l'hydrolyse alcaline des L-α-lécithines comme l'avaient fait auparavant Baer et Kates [37], [49], Forrest et Todd [50], qui ont étudié l'hydrolyse par l'ammoniaque aqueuse du FAD, qui donne le riboflavine-4′, 5′-phosphate, Paladini et Leloir [52], qui ont hydrolysé l'UDP-glucose, par traitement alcalin ménagé, en glucose 1,2-phosphate et, par traitement alcalin plus fort, en glucose 1- et 2-phosphate (25 % : 75 %) — de même en milieu acide, où cependant le glucose-1-phosphate s'hydrolyse tout de suite — et Baddiley et Thain [52], qui ont démontré une instabilité analogue à l'hydrolyse alcaline du CoA.

Un des mécanismes les plus importants en biochimie du point de vue de l'hydrolyse des diesters phosphoriques est celui de la dégradation alcaline du ARN. Brown et Todd ont proposé un mécanisme d'hydrolyse qui passe par un phosphotriester [53]. L'essentiel de cette théorie a été confirmé par Markham et Smith [54], ainsi que par Lipkin et al. [55]. Les expériences de ce dernier avec l'oxygène-18 ont montré qu'il y a incorporation d'un seul atome de ^{18}O, ce qui l'amène à postuler une attaque de l'ion alcoyloxy sur le phosphore : en effet c'est sous cette forme que se présente le OH vicinal en milieu alcalin [56]. Le résultat en est la formation d'un diester cyclique qui s'hydrolyse ensuite.



Ces résultats semblent coïncider avec ceux de la méthanolyse du ARN [57]. Lipkin, en se référant aux travaux de Blumenthal et Herbert [25], croit qu'il y a rupture de la liaison P-O. Dans un autre travail Lipkin [58], utilisant l'anion t-butoxyde comme catalyseur apporte des preuves supplémentaires pour la formation de phosphates cycliques lors de la dégradation basique du RNA. Selon lui, une base transforme d'abord le OH vicinal en ion alcoyloxy, le cycle se forme et, après, la base ouvre ce cycle par attaque sur le phosphore. Le butoxyde peut bien donner lieu à la formation de l'ion alcoyloxy mais, étant stériquement empêché, n'est pas capable d'ouvrir le cycle, comme le font l'ion hydroxyle ou méthoxyde.

Hock et Huber [59] ont étudié l'hydrolyse de l'ATP et de ses produits de dégradation à des pH différents. Le minimum de la vitesse de dégradation se trouve à pH = 10,5. Les réactions impliquées sont :

$$ATP \rightarrow ADP + P_i$$
$$ADP \rightarrow AMP + P$$
$$AMP \rightarrow \text{ribose} + \text{adénine} + P$$

Toutes ces réactions deviennent plus lentes avec l'augmentation du pH. En milieu fortement alcalin la réaction :

$$ATP \rightarrow AMP + P\text{-}O\text{-}P$$

devient prépondérante. Surtout en présence d'hydroxyde de baryum ou de calcium, cette réaction domine. En présence de ces bases il se forme aussi de l'adénosine-3′, 5′-phosphate. La stabilité est décroissante dans la série AMP, ADP, ATP.

Lipkin et al. [60], [61] ont repris les travaux sur la dégradation de l'ATP et ont trouvé que lors de la dégradation de l'ATP par la baryte il se forme neuf produits, parmi lesquels le -2′,3′-di-O- et le 3′,5′-di-O-phosphoryl-adénosine. Le deuxième de ces produits est un facteur important intervenant dans la stimulation de la phosphorylase du foie (Rall et Sutherland [62] et un intermédiaire dans la stimulation de la phosphorylase adrénalienne induite par l'ACTH (Haynes [63]). Selon Passoneau et Lowry [64] et Mansour [65] ce facteur active aussi la phosphofructokinase partiellement purifiée. Le rapport des stabilités de l'adénosine-3′,5′- et du 2′,3′-phosphate est significatif pour la différence de stabilité entre les cycles à six et ceux à cinq membres.

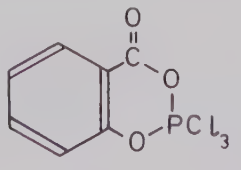
L'hydrolyse des phosphates de sucres a été traitée par Leloir [66]. Déjà Lohmann [67] avait mesuré les vitesses d'hydrolyse de phosphates de sucres pour les utiliser à des fins analytiques.

Desjobert [68] a étudié d'une manière détaillée l'hydrolyse du glucose-1-phosphate à des pH différents. Il démontre que la vitesse d'hydrolyse, très grande à des valeurs de pH acides, tombe entre pH 3 et 4 et devient très petite sinon nulle à des valeurs de pH plus grandes que 4.

En 1949, M. Cohn [69] a fait une étude détaillée de l'hydrolyse du glucose-1-phosphate. Elle a trouvé qu'en milieu acide la rupture a lieu entre le carbone et l'oxygène : le cas est donc semblable à celui de l'hydrolyse du triméthylphosphate, mais contraire à celui des esters carboxyliques [70]. Elle a aussi établi que, même sous des conditions très drastiques, les oxygènes du phosphate n'échangent pas avec le solvant. Il est intéressant de noter que la phosphatase acide comme la phosphatase alcaline scindent entre phosphore et oxygène [71] : le mécanisme de la réaction de ces enzymes est donc le contraire de celui de l'hydrolyse acide. En revanche les phosphorylases du muscle et la sucrose-phosphorylase scindent la liaison C-O-P entre C et O.

1,12 **Phosphates cycliques.**

La chimie organique structurale est née avec les travaux de Kekulé mais aussi avec ceux de Couper. Ce dernier avait déduit de son côté des idées fondamentales sur la structure des corps organiques en étudiant la réaction du méthylsalycilate et de l'acide salycilique avec le PCl_5. Il publia en 1858 ses résultats [72] et donna au produit de cette réaction une structure cyclique :



"Corps de Couper"

Ce produit est relativement stable, comme l'ont démontré déjà Michaelis et Kerkhof [73].

Ce qui compte surtout pour la stabilité d'un cycle phosphorique ce sont, à pH et température donnés :

1° le nombre de membres qui le composent,

2° l'état d'hybridisation de ses membres,

3° la substitution du cycle.

Ces facteurs sont évidemment liés entre eux assez étroitement.

Arbuzow et al. [74] ont fait réagir des α-, β-, γ-, et δ-glycols avec du PCl_3 dans de l'éther sec en présence de pyridine ou diméthylaniline et ont obtenu des cycles du phosphore trivalent à cinq, six, sept et huit membres avec de bons rendements pour les deux premiers et de mauvais rendements pour les deux derniers. De tous les quatre, le phosphite à six membres est le plus stable.

Des sels cycliques de phosphonium ont été préparés par Grim et Schaaf [75], et Goubeau et Wilbonn [76] ont fait des cycles à huit membres contenant silicium, phosphore et oxygène. Des cycles à dix membres de phosphore, carbone et oxygène semblent avoir été obtenus par synthèse, par Rossilskaya et Kabachnik [77].

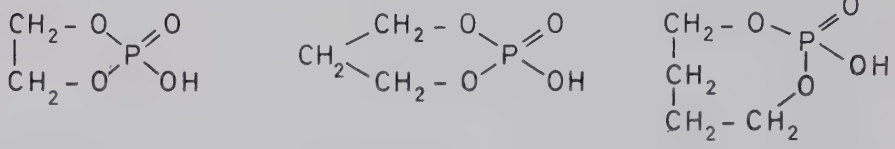
Les cycles les plus intéressants du point de vue biochimique, et les seuls à avoir été trouvés comme métabolites, sont les cycles du phosphore tétracoordonné à cinq et à six membres.

Des études d'hydrolyse alcaline et acide faites sur les différents cycles du phosphore tétracoordonné ont montré que les cycles à cinq membres sont de loin les moins stables, suivis de ceux à six et de ceux à sept membres. A cette règle générale s'ajoute, bien sûr, la réactivité individuellement différente de chaque classe de cycles surtout en fonction de la substitution de ses membres et suivant que le cycle se bâtit en trans ou en cis sur un autre cycle. Les cycles en trans du myoinositol, par exemple, sont moins stables que ceux en cis [78]. Khorana et al. [79] ont prouvé que le thymidine-3′, 5′-phosphate, qui contient un cycle à six membres bâti en trans sur un ribofuranose, est moins stable que le même cycle bâti en cis comme le 1,2-isopropylidène-xylofuranose 3′, 5′-phosphate. Ce dernier est, à son tour, moins stable que le propanediol-1, 3-phosphate simple.

Streitwieser [80], Roberts [81] et Prelog [82], ont donné un aperçu sur la réactivité des cycles en général en fonction de leur taille, et pour le comportement des cycles à cinq ou six membres de carbone une excellente interprétation a été donnée par Brown, Schechter et Brewster [84]. Ces auteurs partent de la notion de « I-strain » — tension intérieure — [85], [86], par laquelle ils entendent la tension intérieure particulière à certains cycles, notion à laquelle est revenu Westheimer pour expliquer la grande labilité des cycles phosphoriques pentaatomiques [86]. Cette tension provient de la distortion des angles de liaison pour les petits cycles (trois-quatre membres), essentiellement donc de la tension de Baeyer, et semble provenir surtout, pour les cycles à cinq et à six membres, de facteurs de répulsion intervenant à cause de conformations moléculaires peu favorables — donc de la tension de Pitzer (contenu d'énergie plus grand par présence de conformations écliptiques) — et de la répulsion de Van

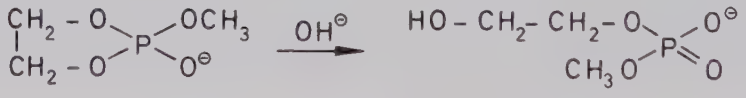
der Waals entre atomes trop rapprochés ou aussi de paires d'électrons solitaires, « non-bonding electrons », trop rapprochées [87], [88].

Pour les cycles phosphoriques la stabilité augmente en passant des cycles pentaatomiques aux cycles heptaatomiques [89], [90], [91], [79], [92], [93], [94] :



Dimroth et Ploch [95] avaient étudié le comportement des glycolphosphites en milieu alcalin, mais ce sont surtout les travaux de Westheimer et al. qui ont éclairé les mécanismes intervenant lors de l'hydrolyse des phosphates cycliques pentaatomiques. Westheimer, Kumamoto et Cox [96] ont trouvé que l'éthylène-hydrogène phosphate hydrolysait en milieu alcalin de un à dix millions de fois plus vite que le diméthylphosphate. Comme la scission du diméthylphosphate par la soude se fait pour environ 10 %, par rupture P-O et qu'en milieu acide la proportion de ce type de scission ne dépasse pas 3 % [86], la vitesse d'hydrolyse de la liaison P–O est environ cent millions de fois plus grande pour l'éthylène-hydrogène phosphate cyclique que pour le diméthylphosphate acyclique. Khorana et al. [97] ont montré à leur tour que le propanediol-1,3-phosphate, cycle hexaatomique, s'hydrolyse légèrement plus vite que le diméthylphosphate, ce qui prouve aussi que le cycle hexaatomique est plus stable que le cycle pentaatomique. Le cycle heptaatomique du butanediol-1,4-phosphate, est encore plus stable que le cycle hexaatomique [97]. Le même rapport des réactivités s'observe à peu près en milieu acide.

L'hydrolyse *alcaline* du méthyléthylène phosphate est accompagnée d'une ouverture du cycle et de la seule rupture P-O [86], [97] :



La différence des chaleurs de saponification de ce triester et du diméthyl-hydroxyéthyl-phosphate est de 5,5 Kcal/mole [99].

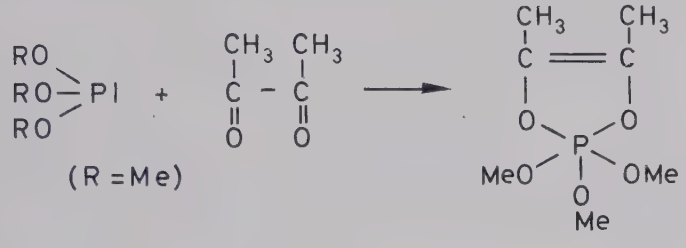
Lors de l'hydrolyse en milieu *acide*, une certaine conservation du cycle semble avoir lieu (Westheimer et Covitz [100]). Ces auteurs ont trouvé qu'à côté de la réaction principale, hydrolyse du méthyl-éthylène-phosphate en méthyl-2-hydroxyéthyl-phosphate, il y avait aussi, pour 5 à 30 %, conservation du cycle diester.

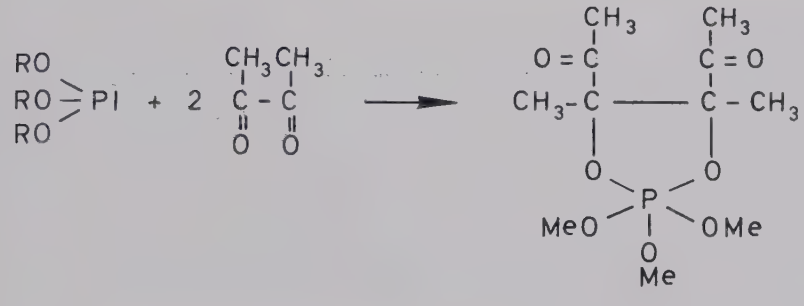
Dans le même article ces auteurs constatent que l'hydrolyse *alcaline* du triester se fait par catalyse générale basique, laquelle est soumise aux empêchements stériques. Ainsi la pyridine augmente la vitesse de la réaction beaucoup plus que la 2,6-lutidine, bien que celle-ci soit une base plus forte. L'imidazol augmente la vitesse de la réaction

encore plus que les deux bases précédentes. L'effet isotopique $\left(\frac{k_{H_2O}}{k_{D_2O}} \simeq 2\right)$, que ces auteurs ont observé, renforce leur thèse selon laquelle, pour cette réaction, il s'agirait plutôt d'une catalyse générale basique que d'une catalyse nucléophile.

Pour expliquer la plus grande réactivité des cycles à cinq membres comparée à celle des esters ouverts correspondants, Westheimer émet l'hypothèse d'une tension intérieure dans ces cycles pentaatomiques [86], [101], qu'il essaie d'expliquer par le caractère de liaison double que pourraient avoir les liaisons P-O de la liaison P-O-C.

Le groupe de travail de Ramirez a publié une série de travaux sur des produits d'addition entre des esters phosphite tertiaires d'un côté et des ortho-quinones et α-dicétones de l'autre. Ces produits sont des dérivés du phosphore pentavalent, des oxyphosphoranes [103], [104] :

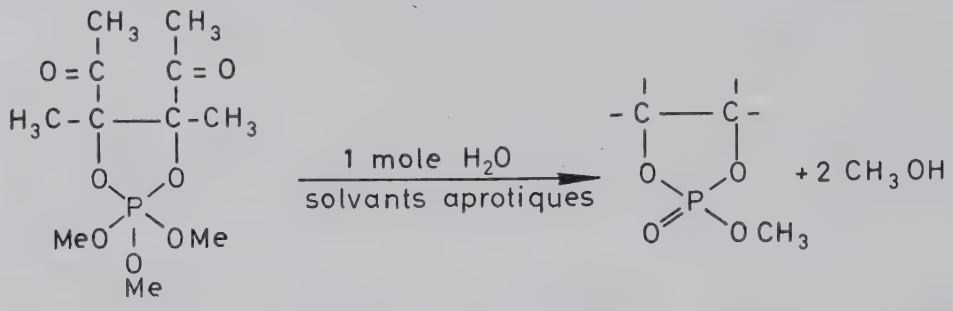




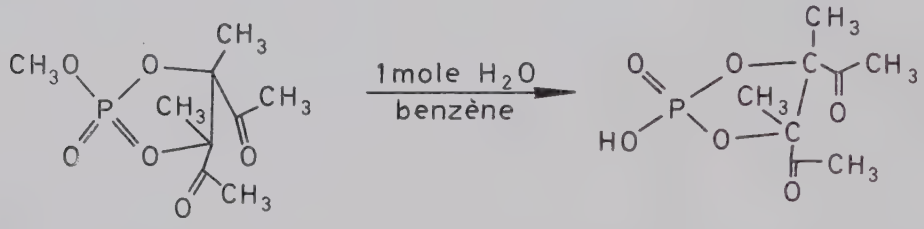
Le même genre de produits est formé comme état de transition lors de l'hydrolyse alcaline des diméthylphosphoacétones [104]. Cette réaction est à peu près deux millions de fois plus rapide ($k_2 = 360$ l. mole^{-1}/s^{-1}) que celle du triméthylphosphate ($k_2 = 1{,}4 \cdot 10^{-4}$ l. mole/s^{-1}). Les auteurs ont postulé une attaque de l'espèce nucléophile sur le carbonyle au voisinage de la liaison ester, formation d'un alcoyloxyde et réaction intramoléculaire de cet ion pour former les produits de la réaction en passant par un intermédiaire cyclique pentavalent. Dans ces hydrolyses, des facteurs stériques interviennent pour empêcher l'attaque directe sur le phosphore et sur le carbone de la liaison ester et nous sommes devant un cas assez rare d'un facteur stérique qui, au lieu de ralentir une réaction, l'augmente.

Les produits avec un phosphore pentavalent sont stables, s'ils sont protégés contre l'oxygène et l'humidité, mais hydrolysent très facilement avec une mole d'eau

dans un milieu aprotique à la température ambiante pour donner des esters tertiaires cycliques du phosphore tétracoordonné [105] :



Ces triesters de leur côté s'hydrolysent rapidement avec une mole d'eau dans le benzène (solvant aprotique), également à la température ambiante, pour donner des diesters cycliques, facilement cristallisables et reconvertibles en triesters par action du diazométhane [106] :



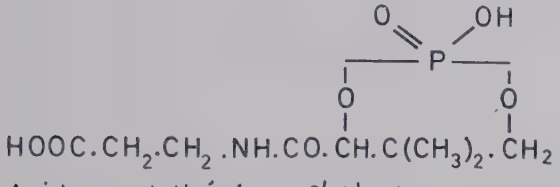
Dans ces conditions le triméthylphosphate et la diméthylphosphoacétone [104] ne sont pas attaqués, ce qui tend à prouver l'influence du cycle phosphorique sur ce genre de réactions. Il semble possible que cette réaction passe aussi par un oxyphosphorane cyclique. Des essais avec de l'eau marquée en ^{18}O ont montré que l'oxygène s'attachait directement au phosphore. Les oxyphosphoranes ont été utilisés par les mêmes auteurs [107] pour synthétiser des composés polyoxygénés comme les α- β-dihydroxy-γ-cétoesters et les α-, β-dihydroxycétones. La structure des oxyphosphoranes a été fortement corroborée par les spectres IR, les spectres Raman et des mesures de RMN du phosphore et de l'hydrogène [108].

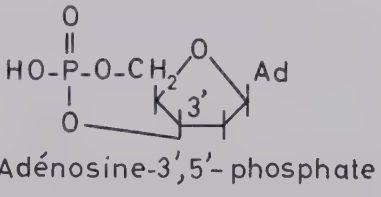
1,2 HYDROLYSE DE L'α-MÉTHYL-D-GLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE, DU β-PHÉNYL-D-GLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE ET DU BUTANEDIOL-1,3-PHOSPHATE

Comparé au grand nombre de cycles pentaatomiques qui ont été trouvés comme intermédiaires pour la dégradation de produits d'importance biologiques, il y a relativement peu de cycles hexaatomiques qui interviennent lors de l'isolement d'une substance naturelle. On sait que l'hydrolyse du 1,2-isopropylidène-xylofuranose-3,5-phosphate avec la soude 1 N donne le -3- et le -5-monophosphates correspondants [91] dans un rapport de 1 : 2,5 et que lors de l'hydrolyse du thymidine-3-*p*-nitrophénylphosphate le -3′,5′-phosphate est formé [109].

Plus de la moitié de l'hydrolyse de ce dernier composé se fait par l'intermédiaire du phosphate cyclique [92].

Lors de l'hydrolyse alcaline de certains pyrophosphates il se forme des phosphates cycliques à six membres, comme lors de la dégradation de l'ATP par la baryte [60], [62] l'adénosine-3′,5′-phosphate et, lors de la dégradation du cœnzyme A, au moins en partie, le 2′,4′-phosphate de l'acide pantothénique [110]. Ce dernier est relativement stable à l'acide, mais est hydrolysé complètement après une heure à 100° par la baryte 0,35 N.

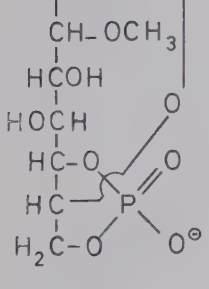




Nous avons commencé nos travaux en recherchant le mécanisme de l'hydrolyse alcaline de l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate, cycle hexaatomique, dont la synthèse avait été faite par Baddiley, Buchanan et Szabo [111].

P. Szabo et L. Szabo ont trouvé, lors de leurs études sur l'hydrolyse alcaline de ce corps, qu'il se formait le -4- et le -6-monophosphate de l'α-méthyl-D-glucoside dans le rapport de 4 à 1 [112], [113]. Ils ont obtenu des résultats analogues pour le β-méthyl-D-galactoside-4,6-phosphate.

Notre but principal était la détermination du lieu de rupture du cycle phosphorique, qui pouvait se faire entre le C et le O ou le P et le O de la liaison C-O-P, sur le carbone *4* ou le carbone *6*. Nous savions déjà que la rupture ne se faisait pas entre le C_4 et l'oxygène, puisque nous n'avions jamais observé une inversion de Walden sur ce carbone, laquelle aurait donné le *galactose*-monophosphate. De l'autre côté, dans le cas d'une rupture entre le C_6 et l'oxygène, nous aurions toujours obtenu l'α-méthyl-D-*glucoside*-monophosphate, parce que le C_6 n'est pas asymétrique. Une rupture C-O serait, par conséquent, passée inaperçue.



Les expériences de Westheimer [86] montrent que, pour l'hydrolyse du diméthylphosphate en milieu alcalin, la rupture se fait presque exclusivement entre le carbone et l'oxygène. En considérant cependant le rapport de 4 à 1 entre le -4- et le -6-monophosphate, obtenu lors de l'hydrolyse alcaline de l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate, nous étions plutôt enclin à expliquer ceci par rupture P-O, étant donné que le groupe alcool primaire est un acide plus fort et par conséquent un meilleur groupe partant, que le groupe alcool secondaire.

Nous étions obligé de nous demander où avait lieu la rupture du cycle hexaatomique.

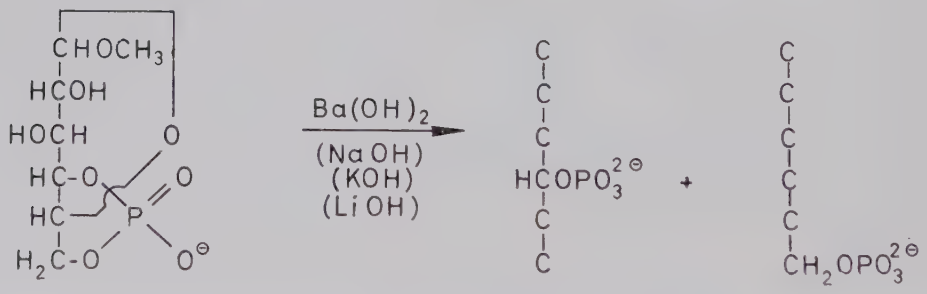
La molécule à hydrolyser étant un oside, et par conséquent instable en milieu acide, nous avons fait toutes nos hydrolyses en milieu alcalin, dans lequel les osides sont stables.

Une partie des hydrolyses a été effectuée dans de l'eau marquée avec ^{18}O, un des six isotopes stables connus de l'oxygène. Cet isotope, découvert en 1929 en même temps que l'oxygène-17 par Glauque et Johnson, se trouve dans la nature dans une abondance de 0,204 atomes pour cent, c'est-à-dire que le rapport $^{16}O/^{18}O$, déterminé par Nier [115], est de 489,2 $\pm$ 0,7. Un excellent aperçu sur le domaine des isotopes stables de l'oxygène a été donné par Samuel et Steckel [115]. La méthodologie des isotopes de l'oxygène, leur application en chimie organique et les synthèses accomplies en utilisant ces isotopes sont également décrites [116], [117], [118].

Dès le début de nos expériences, il s'agissait de savoir si des échanges isotopiques entre la substance dissoute et le solvant pouvaient avoir lieu. La littérature est assez avare et parfois même contradictoire à ce sujet, comme le fait remarquer justement Kamen [119] et comme le prouvent les publications de Titani et al. [120] et de Winter [121]. Les premiers trouvent un échange complet entre l'oxygène du KH_2PO_4 et celui de l'eau à 100° pendant 100 h, tandis que Winter et al. ne trouvent aucun échange sous les mêmes conditions en 41 h. Welch ([9], p. 19) a trouvé que le phosphate inorganique échange en fait l'oxygène avec l'eau par un mécanisme similaire à celui de l'hydrolyse du méthylphosphate. La relation entre la vitesse d'échange et le pH donne la même courbe bien que la vitesse elle-même soit environ dix fois plus petite que celle de l'hydrolyse.

Nos propres résultats en ce qui concerne l'échange isotopique lors de l'hydrolyse du cycle phosphorique en milieu *alcalin* indique que, dans ce milieu, il n'y a pas d'échange isotopique de l'oxygène, ni entre le sucre, ni entre le phosphate et l'eau. Sur le faible échange qui s'opère entre le phosphate inorganique et l'eau lors de l'incubation avec la phosphatase alcaline, nous reviendrons plus loin.

Pour déterminer l'endroit de la rupture du cycle phosphorique selon :



nous avons hydrolysé l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) dans des solutions relativement concentrées de 0,20-0,35 M en sucre et de 0,5-0,7 M en baryte, soude, potasse ou lithine à des températures de 80°-100° pendant des temps variant de 2 h à 4 jours.

Les premières hydrolyses ont été effectuées en tube scellé, les autres dans des petits ballons surmontés d'un réfrigérant et de tube à chaux sodée.

Au début nos essais portèrent sur l'hydrolyse du 4,6-phosphate par la baryte. Le phosphate cyclique était chauffé pendant 3-4 h à 100° dans de l'eau dans laquelle ont été dissous des quantités suffisantes de baryum métallique pour amener la normalité dans les limites énoncées plus haut. Les solutions étaient toujours homogènes, un léger

trouble parfois provenant de traces de carbonate de baryum formé : l'agitation n'était donc pas nécessaire. Nous nous sommes convaincu, après chaque hydrolyse, par chromatographie sur papier, que le phosphate cyclique avait bien disparu pour donner le mélange des monophosphates et une petite quantité de phosphate de baryum, qui avait précipité. Le pH de la solution n'avait pas changé, étant d'environ 13 au début et à la fin de l'expérience. Après avoir bien écarté le précipité de phosphate (et un peu de carbonate) de baryum, les monophosphates ont été précipités à un pH de 7-8 (deuxième pK_a de l'acide phosphorique) par addition d'éthanol et séchés à environ 90° à 0,01 mm de mercure sur du P_2O_5 pour enlever les traces d'eau.

Pour scinder les monophosphates en glucoside libre et phosphate inorganique nous nous sommes servi de la phosphatase alcaline de l'intestin de veau purifié :

α-méthylglucoside-4-et-6-phosphate $\xrightarrow{\text{Phosphatase}}$ α-méthylglucoside + $HPO_4^{2\ominus}$

La phosphatase alcaline de l'intestin a son maximum d'action à un pH d'environ 9 et une température de 37° en présence d'ions magnésium, zinc ou cobalt-bivalent (les acides aminés augmentent cet effet [122], [123]). Il est bien connu depuis les travaux de Stein et Koshland [124] et, récemment, de Haake [125], que la rupture de la liaison C-O-P en présence de cette phosphatase se fait entre P et O par une réaction de déplacement de type inversion de Walden. Le phosphate inorganique étant lui-même un substrat pour la phosphatase alcaline, un échange d'isotope a lieu, qui n'influence d'ailleurs que très peu les résultats. A titre d'exemple, le KH_2PO_4 incubé pendant 52 h en présence d'une quantité forte d'enzyme donnait à l'analyse, un excès de 0,084 % atome d'oxygène-18 au lieu d'un excès de 0,01 % atome pour le contrôle [126]. Nous n'avons jamais observé une valeur dépassant ces données, utilisant de toute façon des concentrations en enzyme plus petites et des temps d'incubation plus courts, au moins en ce qui concerne les expériences sur l'hydrolyse des phosphates cycliques des sucres.

Après l'hydrolyse enzymatique, le phosphate inorganique et le glucoside ont été mis en évidence par chromatographie en employant respectivement le réatif pour les phosphates et le réactif periodate-benzidine (voir partie expérimentale).

Le phosphate inorganique et le méthylglucoside ont été séparés des protéines de l'enzyme par filtration sur gel Sephadex. En faisant passer la solution deux fois dans ces conditions, nous avons obtenu une très bonne séparation du sucre, repéré selon la méthode de Dubois et al. [127], et de l'enzyme, mis en évidence par absorption UV à 2.800 Å. Le phosphate inorganique, qui, dans les conditions de notre travail n'avait été que très peu séparé du sucre, a été précipité par la baryte. L'excédent de baryte a été enlevé avec la résine IR-120 (H) jusqu'à pH 7. L'élimination du baryum par addition de sulfate d'argent ne nous a pas donné satisfaction, car les traces d'oxyde d'argent formées souillaient invariablement les produits finaux. La solution est alors évaporée à sec et le sucre cristallise par addition d'éther à une solution méthanolique.

Pour mesurer l'abondance isotopique de l'oxygène-18 nous avions envisagé d'abord trois méthodes.

L'analyse par spectrométrie de masse est la plus répandue et la mieux connue. Cette méthode nécessite un appareillage coûteux qu'un laboratoire de chimie peut rarement se permettre d'acquérir. Les résultats de cette méthode sont cependant d'une exactitude considérable même quantitativement, une fois que la substance à analyser se trouve sous forme de CO_2. Ceci explique pourquoi la plupart des travaux employant l'oxygène-18 ont été faits par cette méthode. L'analyse par spectrométrie de masse est faite, l'oxygène étant sous forme gazeuse ou sous forme de CO_2. La hauteur des pics obtenus pour les différentes masses de CO_2 contenant plus ou moins d'isotope-17 ou 18 permet de calculer directement la teneur d'isotope (en atome-%) en employant la formule :

$$^{18}O = 0{,}96 \cdot \frac{\frac{(46)}{(44)+(45)}}{2 + \frac{46}{(44)+(45)}} \cdot 100$$

pour des concentrations jusqu'à 5 % de ^{18}O.

Les produits contenant le ^{18}O doivent donc, pour l'analyse, être transformés auparavant en CO_2 (ou en H_2O, qui peut être équilibré avec le CO_2 selon la formule :

$$CO_2 + H_2{}^{18}O \rightleftarrows C^{16}O\,{}^{18}O + H_2{}^{16}O$$

réaction pour laquelle la constante d'équilibre est d'environ 2). Des méthodes très variées ont été conçues pour cela [127], [128], [129] à [139], mais elles donnent souvent des valeurs assez différentes entre elles.

Le processus d'analyse par spectrométrie de masse est, en règle générale, assez long, et nous avons pensé utiliser l'analyse d'activation comme deuxième méthode pour mettre en évidence l'isotope que nous cherchions. Cette méthode semble avoir été employée pour le dosage de l'oxygène-18 avant nous seulement par Calvin et al. [140] et consiste dans le bombardement, par des protons, de l'échantillon disposé sur un support ne donnant pas par réaction nucléaire des produits radioactifs susceptibles de gêner la détection de l'isotope recherché; en l'occurrence nous avons utilisé le tantale. L'oxygène-18, ayant un rayon de capture de 0,2 barn (1 barn = 10^{-24} cm) réagit avec des protons selon la réaction nucléaire $^{18}_{8}O\ (p, n)\ ^{18}_{9}F$ pour donner du fluor-18 qui est un émetteur de positons avec une période de 1,84 h. La quantité de fluor formée étant proportionnelle à la quantité de ^{18}O présente, aux flux des protons bombardants et au temps de bombardement, l'oxygène-18 peut être repéré et dosé par cette méthode, par autoradiographie ou par la méthode des scintillateurs, qui permettent le dosage des positons du F-18. Cette méthode a été employée depuis quelque temps également par d'autres auteurs, surtout par Fleckenstein [142] et par Thompson [143]. Une autre méthode, voisine de celle-ci consiste à compter les neutrons retardés provenant de la réation $^{18}O\,(t, \alpha)^{17}N$, où les tritons sont eux-mêmes générés par la réaction $Li^6\,(n, \alpha)t$ [143].

Nous n'avons pas encore reçu les résultats des échantillons que nous avons donnés à l'irradiation par protons.

Une troisième méthode de détection de l'isotope ^{18}O que nous avions envisagée, pour obtenir des résultats au moins qualitatifs, est la spectrométrie infrarouge. Les

essais que nous avons faits dans cette direction en collaboration avec Mme A. Mathieu de la Fondation Curie, n'ont pas donné de résultats concrets, ce que nous attribuons d'un côté, aux concentrations relativement faibles avec lesquelles nous avons travaillé (moins de 1 %) et, de l'autre côté, aux bandes d'absorption trop larges des phosphates inorganiques que nous avons analysées et sur lesquelles nous reviendrons plus loin. Sans ces deux inconvénients graves nous pensons que cette méthode aurait pu être utilisée dans notre cas, comme en témoignent un grand nombre de publications faites auparavant sur ce sujet, surtout par des travailleurs israéliens [144] à [152].

Les résultats du dosage isotopique que nous donnons dans ce travail proviennent donc de la première méthode, la méthode d'analyse par spectrométrie de masse et les analyses ont été faites au Service de Biologie du C. E. A. et au Weizmann Institute, Réhovoth (Israël).

Tous nos produits qui ont été analysés par cette méthode ont été auparavant analysés par spectrométrie IR et les spectres comparés à des standards préalablement établis. Seuls les échantillons dont les spectres étaient conformes à ceux des produits authentiques ont été soumis à l'analyse par spectrométrie de masse.

Il semble cependant que pour certains corps les spectres IR, qui dépendent de plusieurs facteurs, puissent être assez différents pour la même substance [153], [154] et Tolk [155]. Ce dernier auteur surtout a trouvé que certains échantillons ont un comportement anormal lorsqu'ils sont dispersés dans les halogénures des métaux alcalins, comme c'est le cas lorsque l'on emploie la méthode des pastilles de KBr. L'acide benzoïque ou succinique est adsorbé sur le KBr ou KCl, l'α-naphthylacétamide montre un polymorphisme et la succinimide forme des produits d'addition : tous ces facteurs changent plus ou moins les spectres IR. Un spectre anormal pour l'inositolmonophosphate a aussi été trouvé par Brown et al. [156], selon la façon dont le produit avait été précipité, et par Westheimer et Covitz [100], qui ont trouvé que l'humidité pouvait changer la position d'une bande dans le spectre. Corbridge et Lowe [157] ont remarqué que des formes cristallines différentes de la même substance pouvaient avoir des spectres dont les bandes sont plus ou moins déplacées. En très bon accord avec ces mêmes auteurs, nous avons trouvé, pour nos orthophosphates acides, des spectres avec des bandes très larges et assez peu résolues. En voici les principales pour le KH_2PO_4 :

environ 900 Kayser (cm^{-1}) fo, tl provenant vraisemblablement de P-O
environ 1 100 Kayser (cm^{-1}) fo, tl provenant vraisemblablement de P-O ionisé;
environ 1 300 Kayser (cm^{-1}) fo, tl provenant vraisemblablement de P-O ionisé;
environ 2 350 Kayser (cm^{-1}) fai, l provenant vraisemblablement de P-O-H;
environ 2 750 Kayser (cm^{-1}) fai, l provenant vraisemblablement de P-O-H

(les abréviations signifiant : fo, bande forte; tl, bande très large; l, bande large; fai, bande faible.)

Nous avons trouvé que les spectres de quelques phosphates inorganiques que nous avons analysés par absoption IR variaient sensiblement en fonction surtout de la façon dont ils avaient été précipités. Ainsi nous avons obtenu deux spectres très différents de deux échantillons de KH_2PO , dont l'un avait des bandes d'absorption minces, tandis que l'autre montrait des bandes très larges. Les analyses chimiques et les essais

faits sur la thermobalance nous prouvaient que nous étions bien en présence de KH_2PO_4. Nous n'avons cependant pas pu trouver de grandes différences dans les diagrammes de diffraction aux rayons X que nous avons faits des deux échantillons en question.

Les spectres pris pour l'α-méthyl-D-glucoside correspondaient exactement au spectre du produit de référence pur.

1,21 **Hydrolyses par la baryte.**

Selon les mécanismes de réaction connus et traités dans la partie introductive, le sucre *ou* le phosphate inorganique devraient contenir après l'hydrolyse du cycle *1* atome de ^{18}O par molécule initiale de phosphate cyclique (ceci évidemment en supposant que l'eau employée pour l'hydrolyse contenait 100 % d'oxygène-18). Le résultat du dosage isotopique pour l'hydrolyse de l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate est le suivant (analyse n° 15) :

Phosphate inorganique (KH_2PO_4)	0,980 % atome-excès
α-méthyl-D-glucoside	0,000 % atome-excès
Eau utilisée pour l'hydrolyse	4 % atome-excès

Nous pouvons donc affirmer que l'hydrolyse du cycle hexaatomique de l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate par la baryte se fait uniquement par rupture de la liaison P-O, aucune rupture entre C-O n'ayant lieu. Le résultat attendu pour ce genre de rupture était d'environ 1,00 % atome-excès pour l'incorporation de l'atome d'oxygène-18 par reste de phosphate : la valeur de 0,98 % atome-excès est donc excellent.

Nous avons fait une hydrolyse sous des conditions identiques du même phosphate cyclique où seulement l'aglycone, α-méthyl, avait été remplacé par le β-phényl. Ce remplacement du méthyl par le phényl a une influence sur la vitesse d'hydrolyse qui est bien plus grande pour le β-phényl-D-glucoside-4,6-phosphate. Son hydrolyse par la baryte est terminée en 2 h environ alors qu'il faut 3 à 4 h pour l'α-méthyl-4,6-phosphate. Nous avons préparé par synthèse le β-phényl-D-glucoside-4,6-phosphate par la méthode indiquée dans la thèse de P. Rivaille [158], que nous avons un peu modifiée pour obtenir des rendements meilleurs.

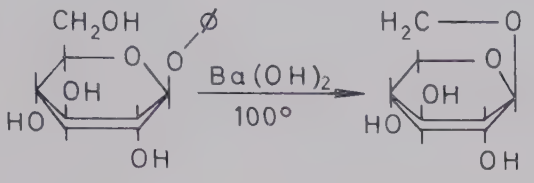
Nous avons isolé, dans le cas de l'hydrolyse du β-phényl-glucoside-4,6-phosphate, aussi bien le phosphate inorganique que le β-phényl-glucoside, après avoir procédé de la même façon que pour l'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate : après l'hydrolyse proprement dite, suivie de l'hydrolyse enzymatique, le sucre pur et le phosphate inorganique pur (vérification par absorption IR) ont été soumis au dosage isotopique (analyse n° 18) :

Phosphate inorganique (KH_2PO_4).....	0,980 % atome-excès
β-phényl-D-glucoside	0,000 % atome-excès
Eau utilisée.....	4 % atome-excès

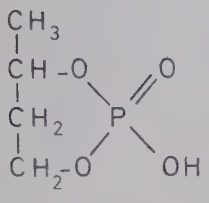
Les résultats de l'hydrolyse du β-phényl-D-glucoside-4,6-phosphate concordent donc entièrement avec ceux de l'hydrolyse du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate.

La quantité de phényl-glucoside présente au terme des réactions d'hydrolyse est bien plus petite que la quantité de méthyl-glucoside correspondante : nous attribuons

cela au fait que le phényl-glucoside-4-phosphate peut subir en milieu alcalin une transformation secondaire pour donner un dérivé phosphorylé du lévoglucosane, le 1,6-anhydro-D-glucopyranose-4-phosphate, que nous avons mis en évidence sur chromatogramme. En effet il est bien connu que les β-glucosides aromatiques donnent à 100°, avec des bases, telles la baryte, la soude ou la potasse, du lévoglucosane selon la réaction [159], [160] :

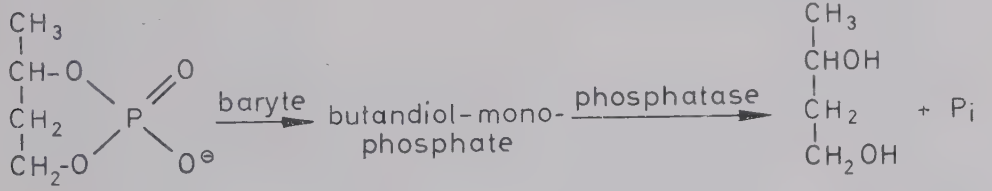


Afin de pouvoir examiner dans quelle mesure les résultats que nous avons obtenus lors de l'hydrolyse alcaline des phosphates cycliques d'osides étaient propres aux phosphates cycliques hexaatomiques, nous avons préparé par synthèse le phosphate cyclique hexaatomique le plus simple, bâti sur un groupe OH primaire et un groupe OH secondaire; cet ester est le butanediol-1,3-phosphate :



Nous avons phosphorylé le butane-1,3-diol avec le dichlorophénylphosphate pour obtenir le butanediol-1,3-(phényl-phosphate), d'abord sous forme d'une huile ayant un coefficient de diffraction de 1,5118 à 23°, puis aussi sous forme cristalline. Le radical phényle, protecteur de ce triester, a été éliminé par hydrogénation en présence de noir de platine et le butanediol-1,3-phosphate, isolé sous forme de sel de baryum, cristallisant avec une molécule d'eau.

Dans une série d'expériences nous avons hydrolysé ce sel de baryum du butanediol-1,3-phosphate par la baryte. Sa vitesse d'hydrolyse était beaucoup plus petite que celle des phosphates cycliques des sucres; elle était totale seulement après environ 20 h d'hydrolyse. Le produit de l'hydrolyse, probablement un mélange des butanediol-1-et-3-phosphates (voir dans la partie expérimentale nos expériences en NMR sur le proton de ces monoesters), a été ensuite soumis à l'action de la phosphatase alcaline et le phosphate inorganique formé isolé :



Le phosphate inorganique obtenu sous forme de KH_2PO_4 a été vérifié par spectrométrie IR avant d'être analysé par spectrométrie de masse, laquelle a donné le résultat suivant (analyse n° 24 *b*) :

Phosphate inorganique (KH_2PO_4)	0,873 ± 0,005	% atome-excès
Eau utilisée	4,00	% atome-excès

Nous voyons que le nombre d'atomes d'oxygène-18 incorporés dans le radical phosphoryle pendant l'ouverture du cycle phosphorique hexaatomique du butane-1,3-diol est égal à l'unité, tout comme dans le cas des phosphates hexaatomiques des sucres.

La différence entre la valeur trouvée (0,873) et celle de 0,980 trouvée pour les analyses précédentes peut provenir soit du temps d'incubation très long avec la phosphatase (88 h), pendant lequel la phosphatase a pu catalyser un échange isotopique, lequel, comme nous l'avons vu précédemment, bien qu'étant petit, existe néanmoins, soit d'un échange entre l'eau et le silicate du verre, une réaction également connue.

1,22 **Contrôle de la réaction d'incorporation.**

1° Échange entre les phosphates cycliques et l'eau.

Pour élucider le mécanisme de réaction de cette hydrolyse nous avons fait une série d'expériences avec l'intention de réisoler une partie du phosphate cyclique après l'avoir soumis pendant un certain temps (environ le temps de demi-hydrolyse) à l'hydrolyse, d'effectuer, par conséquent, une demi-hydrolyse. Un mécanisme qui impliquerait une réaction réversible avec l'eau devrait provoquer une incorporation d'isotope dans le produit de départ.

Nous avons, par conséquent, chauffé l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate dans une solution obtenue par dissolution de baryum dans de l'eau enrichie en ^{18}O pendant 20 mn environ à 100°, arrêté l'hydrolysé par refroidissement et réisolé le phosphate cyclique en le séparant par chromatographie sur papier Whatmann 3 MM et élution. Le sel de baryum du phosphate cyclique réisolé a été analysé par IR et par spectrométrie de masse; cette dernière n'a pas montré d'incorporation d'isotope lourd dans le phosphate cyclique (analyse n° 26) :

α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate	0,005 % atome-excès
Eau utilisée.....	4, % atome-excès

Il n'y a donc eu ni échange isotopique ni refermeture du cycle.

Une expérience analogue a été faite avec le butanediol-1,3-phosphate, lequel a été soumis à l'hydrolyse pendant 30 mn avant d'être réisolé, sous forme spectroscopiquement (IR) pure. L'analyse isotopique montre que dans ce cas également il n'y a pas eu d'incorporation (analyse n° 04) :

Butandiol 1,3-phosphate.....	0,004 % atome-excès
Eau utilisée.....	1,88 % atome-excès

Pour examiner le comportement des phosphates cycliques hexaatomiques en milieu *neutre* en présence et en absence d'ions baryum, nous avons chauffé pendant 4 h une solution d'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate sous forme de son sel de cyclohexylammonium dans de l'eau enrichie en ^{18}O et nous avons réisolé le phosphate cyclique. Nous ne pouvions pas déceler de trace d'hydrolyse par chromatographie sur papier de ce phosphate cyclique, et la spectrométrie IR nous montrait que nous avions bien isolé le corps de départ. Le dosage isotopique a montré l'absence de toute incorporation (analyse n° 28) :

α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate	0,009 % atome-excès
Eau utilisée.....	1,88 % atome-excès

Le même corps a été chauffé à 100° pendant 4 h en présence d'ions baryum toujours à pH 7 en solution dans de l'eau enrichie en ^{18}O après que l'on eut enlevé les ions cyclohexylammonium. Dans ce cas également il n'y avait pas de trace d'hydrolyse, et l'analyse isotopique n'a pas donné d'incorporation d'isotope lourd (analyse n° 03) :

α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate	0,005 % atome-excès
Eau utilisée	1,88 % atome-excès

Nous pouvons donc conclure que la réaction d'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques implique un mécanisme pour lequel il n'y a pas d'incorporation d'oxygène-18 dans le phosphate cyclique de départ et pour lequel la présence conjuguée d'ions métalliques et d'ions hydroxyle est indispensable.

2° Échange isotopique entre les monoesters et l'eau.

Pour exclure la possibilité d'un échange isotopique à l'échelle des monophosphates, nous avons examiné le comportement de ceux-ci dans les conditions d'hydrolyse que nous employons pour les phosphates cycliques.

Nous avons chauffé une solution d'α-méthyl-glucoside-6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) dans de la baryte (préparée par la dissolution de baryum métallique dans de l'eau enrichie en ^{18}O) à 100°, pendant 16 h. Le monophosphate réisolé et soumis aux critères habituels, n'a pas montré d'incorporation de l'isotope ^{18}O (analyse n° 32) :

α-méthyl-glucoside-6-phosphate	0,001 % atome-excès
Eau utilisée	1,88 % atome-excès

Ceci prouve qu'à l'échelle des monophosphates il n'intervient pas de mécanisme d'échange isotopique.

1,23 **Hydrolyse par soude et potasse.**

Les résultats que nous avons obtenus en hydrolysant l'α-méthyl-ou le β-phényl-glucoside-4,6-phosphate par la soude ou la potasse ne sont pas aussi clairs que ceux obtenus en présence de baryte, malgré de très nombreux essais (donnés dans la partie expérimentale). Ceci peut être dû à plusieurs facteurs, dont l'un est sûrement la durée très grande de l'hydrolyse qui est nécessaire dans ces cas et qui facilite évidemment beaucoup les échanges isotopiques non contrôlables, par exemple ceux avec les silicates du récipient. Ce genre d'échange est bien connu (communication privée du Professeur D. Samuel du Weizmann Institute, Rehovoth, Israël et [121]).

Afin de pouvoir tirer des résultats valables de ces expériences, nous avons déterminé l'abondance isotopique non seulement pour les glucosides et le phosphate inorganique correspondant, mais aussi pour les produits de la réaction primaire, c'est-à-dire, les monophosphates.

Les résultats obtenus pour les différentes hydrolyses, bien que donnant des valeurs absolues très basses, sont tout de même sensiblement identiques, ce qui ressort clairement du tableau suivant :

NUMÉRO ANALYSE	RÉSULTATS DE L'ANALYSE ISOTOPIQUE (EN % ATOME-EXCÈS)				
	MONOPHOSPHATE	RAPPORT VALEUR TROUVÉE/ VALEUR THÉORIQUE	KH_2PO_4	RAPPORT VALEUR TROUVÉE/ VALEUR THÉORIQUE	% APPROXIMATIF DE RUPTURE P-O
	Hydrolyse du β-phényl-D-glucoside-4,6-phosphate				
38	0,12	*0,60*	0,16	*0,38*	63
	Hydrolyse de butanediol-1,3-phosphate				
34	0,18	*0,58*	0,17	*0,36*	62

Nous pouvons, par conséquent, affirmer qu'en présence de Na (K) le pourcentage de rupture P-O n'est plus de 100 % domme dans le cas des hydrolyses faites en présence de baryum. L'hydrolyse s'effectue donc en partie par scission C-O et le pourcentage de rupture P-O ou C-O respectivement reste le même en première approximation aussi bien pour le cycle hexaatomique bâti sur le sucre que pour celui bâti sur le butanediol.

Pour confirmer ces résultats avec des valeurs absolues plus élevées, c'est-à-dire avec moins de pertes par échange isotopique non-contrôlé, ces hydrolyses, qui ne relèvent pas du présent travail, devront être répétées dans d'autres conditions expérimentales.

1,3 ÉCHANGE ISOTOPIQUE SUR MEMBRANE

Nous avons mentionné dans le chapitre précédent les difficultés rencontrées pour la séparation des protéines du phosphate inorganique formé pendant l'hydrolyse enzymatique des monophosphates.

Une modification dans la méthode de l'isolement du phosphate inorganique après l'hydrolyse enzymatique nous a permis de découvrir un phénomène dont nous ne pouvons pas encore tout à fait mesurer l'importance.

Pour accélérer ce processus de l'isolement du phosphate de la solution dans laquelle il se trouve en présence de protéines enzymatiques, nous avons essayé d'employer un appareil connu sous le nom de dessaleur (« desalter »). Celui-ci consiste en trois compartiments (*fig.* 1) :

— compartiment cathodique (*c*);
— compartiment du milieu (*m*);
— compartiment anodique (*a*).

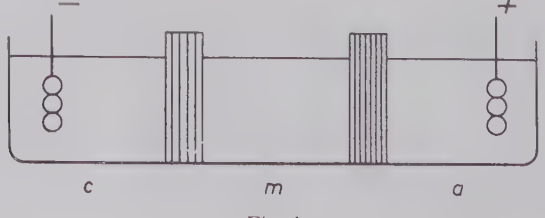


Fig. 1.

Dans le compartiment *c* on place une solution 0,2 N d'acide sulfurique, dans le compartiment *a* de la soude 0,2 N également et dans celui du milieu on introduit à la pipette la solution que l'on veut dessaler. En effet cet appareil sert à enlever des ions inorganiques de solutions physiologiques ou de mélanges de protéines. Les compartiments *c* et *m* sont séparés par une membrane échangeuse de cations et les compartiments *m* et *a* par une membrane échangeuse d'anions.

Lorsqu'on applique une tension continue aux électrodes qui plongent l'une dans la soude et l'autre dans l'acide sulfurique, il y a un transport de cations à travers la membrane échangeuse de cations et d'anions à travers celle échangeuse d'anions. Ce qui est important c'est que seules les petites molécules peuvent passer par les membranes, les grandes étant retenues dans le compartiment *m*. L'intensité du courant, d'ailleurs réglable, diminue au fur et à mesure que le compartiment *m* s'appauvrit en « petits » ions. Il semble cependant difficile d'enlever entièrement ces ions.

Nous avons utilisé cet appareil en quelque sorte à l'envers puisque, l'ayant bien fait travailler de la manière décrite, nous nous sommes occupé uniquement du phosphate inorganique qui a traversé la membrane échangeuse d'anions et qui se trouvait donc à la fin de l'expérience dans le compartiment *a*, et non de ce qui restait dans le compartiment du milieu.

La durée de cette opération qui d'un côté est une électrolyse et de l'autre un échange ionique (où interviennent aussi des phénomènes d'osmose) dépend essentiellement de la concentration des solutions dans les trois compartiments et de la tension appliquée aux bornes. Le courant qui passait variait entre 4 et 80 mA.

Ayant séparé pour quelques hydrolyses le phosphate inorganique des protéines enzymatiques de cette façon, nous nous sommes rendus compte que le contenu de ^{18}O dans les phosphates qui avaient traversé la membrane échangeuse d'anions était inférieur à celui des phosphates isolés par voie purement chimique.

Pour étudier plus amplement ce phénomène nous avons fait passer à travers la membrane du phosphate inorganique ayant un contenu isotopique connu. Le KH_2PO_4 isolé après passage de la membrane était devenu plus pauvre en isotope lourd :

KH_2PO_4 de départ, mis dans le compartiment m....	0,777 % atome-excès
KH_2PO_4 réisolé après passage de la membrane	0,577 % atome-excès

D'autres résultats prouvent également, bien que d'une manière indirecte, le phénomène d'appauvrissement sur membrane.

Ainsi nous avons obtenu une incorporation de 0,777 % atome-excès, au lieu de 0,980 %, pour le KH_2PO_4 ayant traversé la membrane échangeuse d'anions et provenant de l'hydrolyse par la baryte de l'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate (analyse n° 22).

Le KH_2PO_4 résultant de l'hydrolyse du butanediol-1,3-phosphate par la baryte et qui avait traversé la membrane échangeuse d'anions avait également perdu de son contenu isotopique en ^{18}O, puisque celui-ci était de 0,620 % atome-excès au lieu de 0,980 % (analyse n° 23).

Après l'hydrolyse enzymatique des butanediol-monophosphates formés lors de l'hydrolyse du butanediol-1,3-phosphate en présence de baryte (hydrolyse n° 24), nous avons isolé le KH_2PO_4 formé par deux voies différentes pour pouvoir mettre en évidence

l'échange isotopique intervenant sur la membrane. Le KH_2PO_4 isolé par les méthodes purement chimiques que nous avons décrites auparavant, contenait 0,873 % d'atome-excès d'oxygène-18 (analyse n° 24 *b*), tandis que le KH_2PO_4 isolé par passage à travers la membrane échangeuse d'anions s'était appauvri en ^{18}O, ne contenant plus que 0,622 % atome-excès (analyse n° 24 *a*).

La preuve ayant donc été fournie qu'un échange isotopique avait lieu lors du passage de l'anion phosphate à travers la membrane, nous avons essayé d'obtenir le résultat contraire aux expériences précédentes, c'est-à-dire d'enrichir l'oxygène-18 dans nos phosphates par passage à travers des membranes échangeuses d'anions. Nous avons fabriqué un petit appareil semblable à celui décrit plus haut, mais différent de celui-ci en ce qu'il nous permettait d'employer plusieurs membranes que l'ion phosphate, migrant vers l'anode, traverserait successivement, et aussi d'utiliser des quantités plus petites d'eau enrichie en oxygène-18 relativement chère. Cet appareil consiste en plusieurs compartiments séparés par des membranes anioniques pouvant être facilement remplis à l'aide de pipettes Pasteur.

Les membranes sont placées entre des rodages de verre, le tout était inséré entre deux plaques de matière plastique tenues ensemble par des vis filetées de manière que l'on puisse encastrer et serrer un ou plusieurs segments intermédiaires en verre (fig. 2).

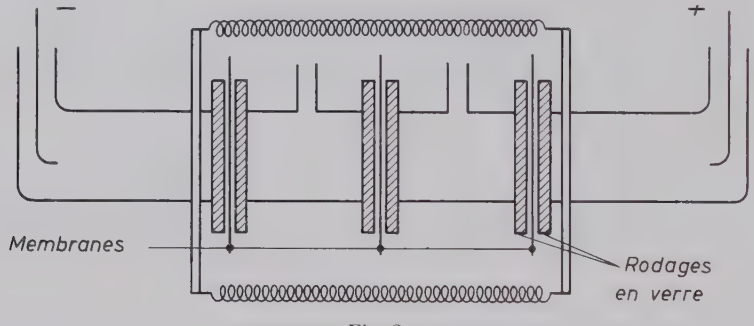


Fig. 2.

La première expérience que nous avons tentée dans le sens d'un enrichissement d'isotope avec cet appareil a été faite avec le KH_2PO_4, en utilisant trois compartiments : dans le premier nous avons placé une solution 0,2 M de ce phosphate dans de l'eau enrichie en ^{18}O, et dans les compartiments *2* et *3* une solution de potasse 0,8 N dans la même eau (*fig.* 3).

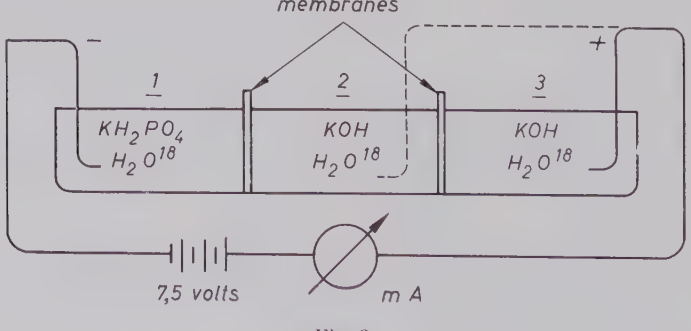


Fig. 3.

L'anode avait d'abord été placée dans le compartiment *3*. L'intensité du courant ayant augmenté d'environ 10 mA à 18 mA en 3 h, nous avons placé l'anode dans le compartiment *2* pour l'augmenter encore. La migration du phosphate a été suivie par des déterminations quantitatives de phosphate, d'après Machebœuf et Delsal [161], dans les trois cellules. Après environ 6 h d'électrolyse totale, la plupart du phosphate se trouvait dans le compartiment *3*, d'où nous l'avons isolé sous forme de KH_2PO_4. Le pH dans les trois compartiments a été maintenu alcalin pendant toute la durée de l'expérience, ceci surtout pour éviter un échange isotopique qui peut avoir lieu en milieu acide ([9], p. 19). L'analyse isotopique a montré que pour cette expérience il n'y a pas eu d'enrichissement en O-18 dans le phosphate (analyse n° 35) :

KH_2PO_4 ..... 0,22 % ^{18}O

Nous avons répété la même expérience avec une concentration double en phosphate et en potasse, pour voir si la concentration avait un effet sur l'échange isotopique. L'analyse isotopique montrait dans ce cas aussi l'absence d'enrichissement (analyse n° 36) :

KH_2PO_4 ..... 0,19 % ^{18}O

Nous avons aussi répété l'essai d'enrichissement avec un phosphate organique, le glucose-1-phosphate, sous forme de sel de potassium. L'analyse isotopique a donné un résultat semblable à celui des analyses précédentes :

glucose-1-phosphate ..... 0,20 % ^{18}O

Ne connaissant pas encore le mécanisme physico-chimique qui prévaut lors de l'appauvrissement de nos phosphates en ^{18}O, nous n'avions pu que procéder d'une manière empirique pour essayer de réaliser la réaction inverse, l'enrichissement. Malgré les premiers résultats négatifs, nous sommes convaincu que cette réaction inverse est possible et nous continuons nos essais dans cette direction.

2 MÉCANISME DE L'HYDROLYSE ALCALINE DES PHOSPHATES CYCLIQUES HEXAATOMIQUES

2,1 EFFETS IONIQUES

Lors des hydrolyses que nous avons effectuées avec des bases différentes nous avons constaté que la vitesse d'hydrolyse est beaucoup plus grande si la réaction se fait en présence de baryte que si elle se fait par la soude ou la potasse, la lithine se situant entre ces deux groupes de bases. Nous étions donc en présence d'un effet ionique très prononcé.

Il est clair que les effets ioniques observés lors de réactions chimiques, et en particulier pour des hydrolyses de corps organiques, sont importants mais aussi très complexes. Pour ne citer qu'un seul exemple, très intéressant, de l'effet que les ions inorganiques exercent, vraisemblablement par complexation de groupes basiques, nous rappelons l'effet que ces ions ont sur le comportement de très grandes molécules telles que les polynucléotides ou les protéines. Neuberg et Mandl [162], Neuberg et Roberts [163] et Lehninger [165] ont donné un aperçu passionnant sur ce domaine. L'influence complexante de petites molécules de phosphate est tellement prononcée que des grandes molécules insolubles comme les protéonucléates ou même des molécules notoirement insolubles tels que le $BaSO_4$, CaF_2 ou Ag_3PO_4 sont remis en solution.

A cause de leur grande charge négative les phosphates ont tendance à s'associer très fortement avec des cations, dans des solutions à toutes concentrations, sauf dans les solutions les plus diluées [165]. Il semble même y avoir une tendance très nette à former des liaisons covalentes, probablement par résonance avec des liaisons π dans le groupe PO_4. L'action complexante des phosphates est tellement grande que Thilo [166] a pu parler, pour les polyphosphates en solution, de leur similarité avec des échangeurs d'ions solides.

Pour la chimie des phosphates ce sont les ions alcalins et alcalino-terreux qui ont acquis une grande importance surtout depuis que l'on s'est rendu compte du rôle joué par ces cations dans un nombre considérable de réactions biochimiques; cependant aucun résultat définitif n'a été donné sur leur mode d'action. Ces cations n'augmentent pas seulement la vitesse d'une réaction donnée, mais très souvent ils sont la condition pour qu'une réaction ait lieu ou pour qu'elle se dirige dans un certain sens, et en général ils exercent leur action par complexation ou chélation. Les facteurs qui influencent le plus la tendance des cations métalliques à former des chélates sont, à part les facteurs stériques, les forces ioniques dépendant de la charge et du rayon du cation et la tendance relative à former des liaisons homopolaires. En outre, les entropies d'hydratation jouent un rôle. Frank et Evans [167], qui ont étudié en détail cet effet, postulent que les ions s'associent avec des molécules d'eau, qui les entourent comme des « icebergs », le tout étant un peu figé, ressemblant à un « partial freezing ». Lorsque les complexes entre

cations et ligands se forment, l'entourage des ions se modifie, les « icebergs » s'effondrent et le changement d'entropie s'ensuivant favorise la formation du complexe. Ceci a été traité d'une manière quantitative par Evans et Uri [168]. La constante de stabilité K pour le complexe formé selon l'équation :

$$M(H_2O)_a + L(H_2O)_b \rightleftarrows ML(H_2O)_c + (a + b - c)\ H_2O,$$

où : M = cation métallique, L = ligand,

a été mise en rapport avec la chaleur de formation et l'entropie d'hydratation du complexe par Williams [169]. Cette chaleur de formation du complexe en solution aqueuse est égale à la différence entre la chaleur de formation du complexe ML à partir d'un cation (sous forme gazeuse) et d'un ligand hydraté et la chaleur d'hydratation du cation. L'énergie libre d'hydratation est proportionnelle à :

$$z/r_e^2 \qquad (r_e = \text{rayon effectif de l'ion}).$$

L'effet de l'hydratation peut être relativement important comme le prouve le travail de Nancollas [170] sur la thermodynamique de l'association ionique entre acétates et formiates d'un côté et alcalino-terreux de l'autre. Le comportement anormal du magnésium est justement expliqué par cet effet d'hydratation, puisque son entropie d'hydratation (— 60) est plus négative que celle du Ba (— 40). On voit qu'un ligand donné ne peut déplacer l'eau aussi facilement qu'un autre, si l'on représente la formation d'un complexe par :

$$M^{2+}(H_2O)_n\ A^- \rightarrow MA^+(H_2O)_{n-1}.$$

De toute façon, pour les alcalino-terreux, il semble que la relation entre l'entropie d'association et l'entropie d'hydratation soit linéaire (*fig.* 4).

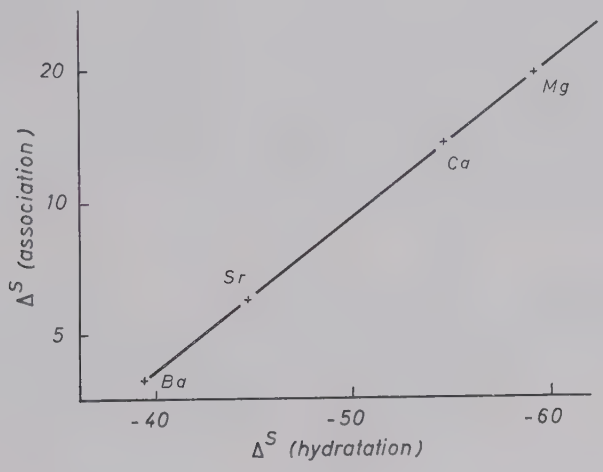


Fig. 4.

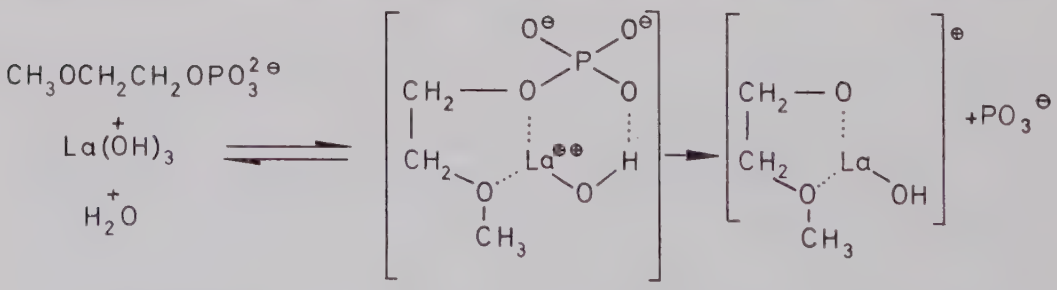
L'influence des cations sur l'hydrolyse de liaisons phosphoriques a été étudiée par un grand nombre d'auteurs. Davies et Monk [171] se sont intéressés à l'effet de la chélation avec les acides phosphoriques condensés (méta-, pyro- et polyphosphates). Cherbuliez, Leber et Stucki [172] ont trouvé que le calcium a une action catalytique

non seulement sur l'hydrolyse des acides phosphoriques condensés et sur celle de l'éthylphosphate, mais aussi sur l'alcoolyse de ce dernier. Ces auteurs trouvent également que l'action catalytique du Sr est faible et celle de Ba nulle.

Le rôle des cations dans beaucoup de réactions enzymatiques est très important, bien qu'assez mal compris pour l'instant dans la plupart des cas. Hers [173] donne cependant une interprétation du rôle du magnésium et du potassium dans la réaction fructokinasique.

L'influence de l'ion baryum lors de l'hydrolyse alcaline de l'ATP [60], [61] est, comme nous l'avons vu, très considérable, puisqu'il n'augmente pas seulement la vitesse de l'hydrolyse, mais il détermine aussi le caractère des produits. L'hydrolyse avec la soude 1 N donne en majeure partie de l'adénine tandis que la baryte 0,4 N change le résultat en donnant l'adénosine-3′- et 5′-phosphate dans le rapport de 5 à 1 (comme pour le thymidine-3′,5′-phosphate de Khorana [79].

E. Bamann et Meisenheimer [174] ont trouvé que des hydroxydes colloïdaux de certains métaux scindent bien des esters phosphoriques. Bamann et Nowotny [175], à la suite de ces travaux, trouvent que la présence d'ions lanthane en milieu alcalin, neutre ou acide, augmente beaucoup la vitesse de saponification d'esters phosphoriques, ce qu'ils expliquent par une catalyse homopolaire (« Hauptvalenzkatalyse ») : des effets inductifs provoqués par la formation d'un sel non-dissocié comme état intermédiaire, où les liaisons esters seraient labilisées, ou plutôt, destabilisées contre l'attaque de l'hydroxyle. Ils postulent une saponification facile pour les esters amidophosphoriques et ceux du type $P(OR)_5$, trouvée en effet déjà par N. H. Stokes [176] et par Anschuetz et Broeker [177]. Il est cependant surprenant que ces mêmes auteurs aient trouvé que des ions comme Li^+, Na^+, Ca^{++}, Sr^{++}, Mn^{++} et Ba^{++} étaient sans effet sur la vitesse d'hydrolyse du glycérophosphate. Bamann et al. ont également publié des travaux sur le mécanisme de réaction et la spécificité de l'hydrolyse d'esters phosphoriques catalysés par des cations métalliques [178], et sur l'effet du lanthane [179], [180]. Westheimer et Butcher [8], qui ont analysé à leur tour l'hydrolyse d'esters phosphoriques accélérée par un gel de $La(OH)_3$, ont trouvé une dépendance du pH identique à celle trouvée par Desjobert pour l'éthyl- et l'hydroxyéthylphosphate. Pour l'hydrolyse du 1-méthoxy-éthyl-2-phosphate par $La(OH)_3$ ils postulent un état intermédiaire suivant :



Sundararajan et al. [182] trouvent que les alcalino-terreux sont très actifs pour la déphosphorylation de phosphoprotéines telles que la caséine, la phosvitine, la lipovitelline et l'ovalbumine. Une scission de phosphoprotéides a été observée aussi par Bamann, Trapmann et Schuegraf [182] : le lanthane agit surtout dans le cas de

la caséine, vitelline et phosphopeptone, tandis que le cerium agit surtout dans le cas des esters phosphoriques de la sérine et, moins, de la thréonine.

Selon Helleiner et Butler [183] la vitesse de l'hydrolyse alcaline du diphénylphosphate et surtout celle du DNA est considérablement augmentée, ou plutôt rendue possible, par la présence d'ions baryum : par la soude seule il n'y a pas d'hydrolyse. Ces auteurs ont montré que, cette hydrolyse ne pouvant avoir lieu, sans la présence de baryum et de OH^-. Cet effet coïncide avec les résultats que nous avons obtenus pour l'hydrolyse de nos cycles hexaatomiques.

2,2 DÉTERMINATION DE LA VITESSE D'HYDROLYSE DE L'α-MÉTHYL-D-GLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE PAR LA MÉTHODE CHIMIQUE

Afin de pouvoir comparer quantativement l'action des différents ions métalliques nous avons, dans une série d'expériences, déterminé les vitesses de l'hydrolyse du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate en présence de ces ions. Les expériences ont été toutes faites à la même température (80°) et en employant des solutions équinormales.

Nous avons rencontré quelques difficultés pour l'analyse des produits formés dans la réaction car il n'existe pas de méthode permettant de doser spécifiquement un phosphodiester en présence de phosphomonoesters et de phosphate inorganique, et surtout en présence d'un très grand excès d'une base. Après plusieurs essais infructueux nous avons finalement utilisé la méthode suivante pour le dosage : à des intervalles déterminés des échantillons sont enlevés du mélange réactionnel et placés dans des fioles jaugées; puis, par addition de toujours la même quantité de résine appropriée tous les cations sont liés et le volume complété avec de l'eau. De la solution ainsi obtenue on absorbe des quantités identiques et connues sur du papier filtre épais (Whatmann 3 MM) en utilisant une microseringue « Agla » et en mettant deux taches identiques sur le même papier. Le chromatogramme est ensuite développé, puis coupé dans le sens de la longueur et les taches contenant du phosphate, révélées sur une bande par le réactif de Hanes et Isherwood [184]. On sépare ensuite par découpage de l'autre bande, l'aire contenant le phosphate, on l'élue avec de l'eau, on lyophilise la solution, puis on dose le phosphate selon la méthode de Machebœuf et Delsal [161].

Les vitesses relatives d'hydrolyse ont été déterminées de cette façon pour les hydrolyses catalysées par le baryum, le potassium (le sodium donne, si l'on tient compte de l'erreur systématique, des résultats analogues au potassium), lithium et potassium en présence de baryum. Dans la figure suivante nous avons porté la quantité de phosphate cyclique non-hydrolysée, exprimée en densités optiques pour le phosphore, en fonction du temps d'hydrolyse, exprimé en heures (*fig.* 5).

L'on peut clairement reconnaître la disparition beaucoup plus rapide du phosphate cyclique dans le cas de l'hydrolyse par la baryte, qui est donc plus rapide; viennent ensuite l'hydrolyse par le mélange de baryte et de potasse, celle provoquée par la lithine et, pour être la plus lente, celle causée par la potasse. Nous avons utilisé les valeurs fournies par ces expériences pour déterminer l'ordre de la réaction, et, approximativement, la valeur de la constante de vitesse, d'après les lois, connues, de la cinétique d'une réaction de deuxième ordre.

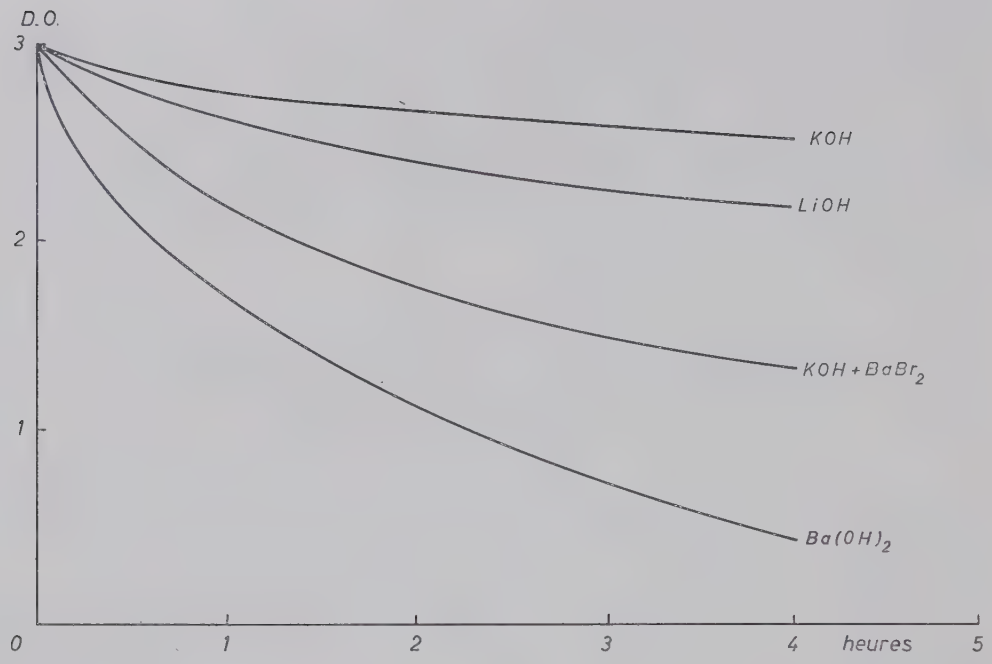


Fig. 5,

Si nous exprimons la cinétique d'une réaction de deuxième ordre par :

$$\frac{dx}{dt} = k_2 (a - x) (b - x),$$

nous obtiendrons, après intégration pour les limites $x = 0$ lorsque $t = 0$,

$$k_2 = \frac{2{,}303}{t(a - b)} \log \frac{b(a - x)}{a(b - x)},$$

équation à laquelle une réaction de cet ordre doit obéir. Dans le tableau suivant on voit que les valeurs de k_2 pour l'expérience faite avec la baryte s'alignent très bien autour de $0{,}732 \cdot 10^{-1}$ (mole^{-1}/l/mn^{-1}) avec des erreurs de moins de 5 %.

$Ba(OH)_2$

t	x	$\frac{2{,}303}{t(a-b)}$	$b(a-x)$	$a(b-x)$	$\frac{b(a-x)}{a(b-x)}$	$\log \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$	k_2
(mn.)	(mole/l.)						mole^{-1}/l/mn^{-1})
0	—	—	—	—	—	—	—
60	0,079	— 1,83	0,0171	0,0188	0,91	— 0,040	$0{,}732 \cdot 10^{-1}$
120	0,107	— 0,92	0,0118	0,0140	0,84	— 0,076	$0{,}699 \cdot 10^{-1}$
180	0,124	— 0,61	0,0085	0,0112	0,76	— 0,12	$0{,}732 \cdot 10^{-1}$
240	0,137	— 0,46	0,0061	0,0089	0,68	— 0,168	$0{,}756 \cdot 10^{-1}$

$a = 1{,}69 \cdot 10^{-1}$ mole/l, $b = 0{,}19$ mole/l.

Ces valeurs coïncident également assez bien avec la valeur de $0{,}896 \cdot 10^{-2}$ $mole^{-1}/l/mn^{-1}$ obtenue pour le 2,3-di-O-benzyl-α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate par une méthode complètement différente, fondée sur des données électrochimiques et sur laquelle nous allons revenir un peu plus loin. Ceci semble indiquer que les deux groupes benzyle diminuent un peu la vitesse de la réaction d'hydrolyse du phosphate cyclique en milieu alcalin.

Pour l'hydrolyse du phosphate cyclique de l'α-méthylglucoside en présence de KOH nous avons obtenu des chiffres qui indiquent que la réaction est également de deuxième ordre, avec une valeur moyenne de k_2 de $2{,}13 \cdot 10^{-3}$ $mole^{-1}/l/mn^{-1}$.

KOH

t	x	$\frac{2{,}303}{t(a-b)}$	$b(a-x)$	$a(b-x)$	$\frac{b(a-x)}{a(b-x)}$	$\log \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$	k_2
(mn.)	(mole/l.)						($mole^{-1}/l/mn^{-1}$)
0	—	—	—	—	—	—	—
60	0,012	— 0,183	0,0596	0,0622	0,959	— 0,018	$3{,}29 \cdot 10^{-3}$ (1)
120	0,018	— 0,0915	0,0574	0,0611	0,94	— 0,023	$2{,}1 \cdot 10^{-3}$
180	0,023	— 0,061	0,0554	0,0603	0,919	— 0,037	$2{,}26 \cdot 10^{-3}$
240	0,027	— 0,046	0,0539	0,0596	0,905	— 0,044	$2{,}02 \cdot 10^{-3}$

$a = 1{,}69 \cdot 10^{-1}$ mole/l, $b = 0{,}38$ mole/l.

(1) Valeur aberrante.

En comparant les constantes de vitesse entre elles nous voyons que la vitesse de l'hydrolyse du phosphate cyclique hexaatomique en présence du cation Ba^{++} est d'environ trente-cinq fois plus grande que celle en présence de K^+ :

$$\frac{k_{2_{Ba}}}{k_{2_K}} = \text{environ } 35,$$

ceci pour des concentrations de substrat et pour des normalités d'ions égales.

2,3 DÉTERMINATION DE LA VITESSE D'HYDROLYSE DU 2,3-DI-O-BENZYL-α-MÉTHYL-D-GLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE PAR MÉTHODE CONDUCTIMÉTRIQUE

Il existe une méthode conductimétrique pour la détermination de l'ordre cinétique d'une réaction [185], [186], [187].

Si la conductibilité d'un mélange réactionnel, L_0 au temps 0, L_∞ au temps infini et L_t au temps t est connue, on peut déterminer la quantité de substance ayant réagi après un temps t, que nous appellerons x, par la formule :

$$x = \frac{L_0 - L_t}{L_t - L_\infty}.$$

En supposant une réaction de deuxième ordre comme étape essentielle pour la vitesse de la réaction, nous pouvons écrire, en prenant des quantités initiales égales de phosphate cyclique et de base ($Ba(OH)_2$) :

$$\frac{db}{dt} = k(a - b)^2,$$

$$b = a.x,$$

$$\frac{dx}{dt} = ka(1 - x)^2, \qquad \frac{dx}{dt} = \int_0^t ka(1 - x)^2,$$

$$\int_0^t \frac{dx}{(1 - x)^2} = ka.dt, \qquad \frac{x}{1 - x} = kat$$

$$k = \frac{1}{a.t} \cdot \frac{x}{1 - x}$$

a = concentration initiale de phosphate cyclique;
b = concentration de monophosphate formé.

Nous avons fait des mesures avec le 2,3-di-O-benzyl-α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium), ce qui nous a permis de mettre en évidence l'influence du groupe benzyle sur la vitesse d'hydrolyse du phosphate cyclique. La valeur de k (que nous appellerons ici k_2 pour souligner qu'il s'agit d'une réaction de deuxième ordre) pour ce corps, déterminée selon la méthode conductimétrique, est de $0{,}896 \cdot 10^{-2}$ $mole^{-1}/l/mn^{-1}$, comparée à celle de $0{,}732 \cdot 10^{-1}$ $mole^{-1}/l/mn^{-1}$ pour le méthyl-α-glucoside-4,6-phosphate. La comparaison des deux mesures fait voir, si l'on exclut une erreur systématique, une faible influence des deux groupes benzyle en 2 et 3 du glucose dans le sens d'une diminution de la vitesse d'hydrolyse.

Il ressort de la comparaison des deux méthodes utilisées pour déterminer la vitesse d'hydrolyse des phosphates cycliques, que la deuxième, fondée sur la conductimétrie, est beaucoup plus simple et beaucoup plus rapide. Cependant, en raison des toutes petites variations de la conductivité que nous avons pu observer, nous considérons la première comme étant plus sûre et plus précise dans notre cas.

2,4-*a* **Effets de dissociation.**

Dans les chapitres précédents nous avons démontré que l'ion Ba, comparé à des ions monovalents tels que sodium, potassium et lithium, accélère particulièrement l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques.

La question qui se pose en premier lieu est de savoir si l'effet catalytique du cation dépend du coefficient de dissociation de la base employée (en d'autres mots de sa dissociation apparente), d'un effet de chélation propre à ce cation ou des deux en même temps. Cette question est d'une importance considérable non seulement pour l'hydrolyse de nos phosphates cycliques mais aussi pour l'interprétation plus claire des résultats obtenus lors de la dégradation des acides ribonucléiques, pour laquelle les mécanismes proposés par Brown, Magrath et Todd [89] et par Lipkin et al. [55]

donnent une explication très plausible suivant laquelle cependant, la question de l'action des cations et du solvant présents n'est justement pas précisée.

Apparemment, la baryte est une base plus faible que la soude. Son action peut cependant être due au fait que, pour la baryte comme pour certains autres hydroxydes, des liaisons homopolaires peuvent s'établir, comme le fait remarquer Davies [188] qui pense que ceci est la raison pour laquelle les hydroxydes de la plupart des métaux sont moins dissociés que leurs sels. La théorie de Bjerrum, en ne considérant que des interactions *purement électrostatiques*, permet de calculer la constante K de dissociation d'une paire d'ions et la distance la plus petite d'approche de ces ions. Davies a alors donné la relation suivante :

$$\mathrm{pK} = 0{,}607\, z^2/r - 1{,}150$$

(où z = valence et r = rayon cristallographique de l'ion respectif). Ceci est mieux llustré par la *figure* 6.

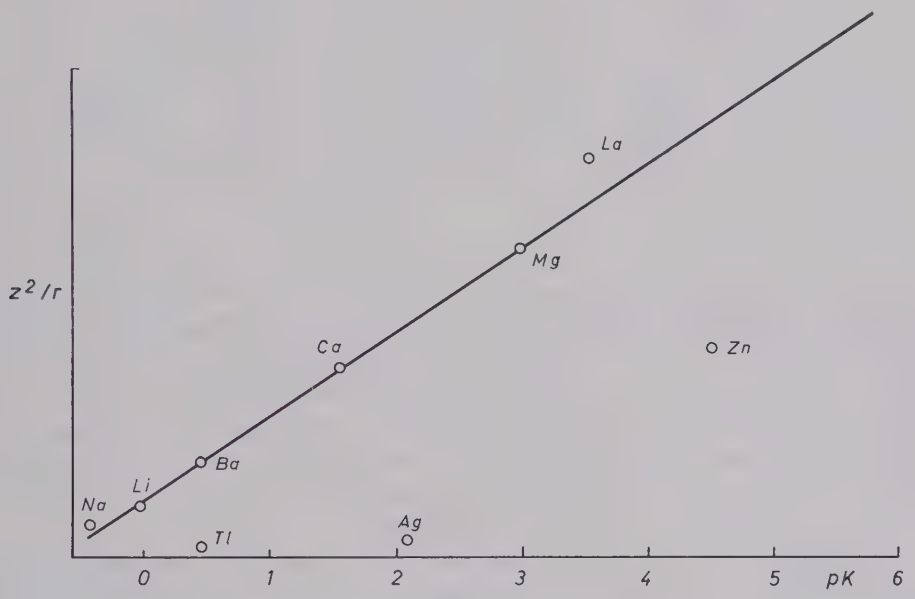


Fig. 6.

On peut se demander si la deuxième dissociation des bases des alcalino-terreux est complète, s'il existe donc, en solution, au moins plus concentrée, la forme $MeOH^+$ (Me = Mg, Ca, Ba). Kilde [189] semble avoir montré le premier que le $Ca(OH)_2$ est incomplètement dissocié en solution aqueuse, qu'il est donc, en ce qui concerne la deuxième dissociation, une base faible ou tout au plus moyenne. Les valeurs des deuxièmes constantes de dissociation ont été déterminées par la suite par Stock et Davies [190] pour le $Mg(OH)_2$, par Bell et Prue [191] et par Davies et Waind [192] pour le $Ca(OH)_2$ et par Davies [193] et Bell et Prue [191] pour le $Ba(OH)_2$. Les valeurs de K_d (constante thermodynamique) pour la réaction :

$$(M, OH)^{(n-1)+} \rightleftarrows M^{n+} + OH^-$$

sont les suivantes :

MÉTAL	K_d
$MgOH^+$	0,0026
$CaOH^+$	0,050
$BaOH^+$	0,23

Les valeurs du coefficient d'activité de Harned et Mason [194] sont beaucoup plus basses pour la baryte que pour le $CaCl_2$ ou le $BaCl_2$. Les auteurs en déduisent également que la réaction $BaOH^+ \rightleftarrows Ba^{+++} + OH^-$ n'est pas complète et ils comparent des données expérimentales dans un petit tableau :

COEFFICIENT D'ACTIVITÉ	MOLARITÉ	α (degré de dissociation de $BaOH^o$)
0,712	0,009974	0,97
0,579	0,03070	0,90
0,526	0,04990	0,88
0,502	0,06151	0,86

De tout ceci nous pourrions déduire avec une certaine justification qu'en effet la forme active dans nos hydrolyses serait la base non dissociée ou au moins l'ion $MeOH^+$. C'est ce que Pfeil [195] a fait dans son travail portant sur le mécanisme de la réaction de Cannizzaro et des autres réactions qui lui ressemblent, celle de Claisen-Tischtschenko, de Zagoumenny et de Meerwein. Déjà Loew [196] a trouvé, en 1888, que la réaction de Cannizzaro (RC) est catalysée plus efficacement par la chaux que par la soude ou la potasse. Pfeil prouve de son côté que la réaction se fait d'autant plus facilement que la base est plus faible, dans l'ordre :

$$Ca(OH)_2 > TlOH > Ba(OH)_2 > LiOH > NaOH, KOH > (CH_3)_4 NOH$$

(où les dernières bases sont, évidemment, les plus fortes). Il en déduit que c'est la base non dissociée qui est le catalyseur, et il montre clairement que la constante de vitesse de la RC dépend du coefficient d'activité de la base employée.

Nous avons trouvé le même ordre d'activité pour les bases que nous avons employées, et trouvé aussi que l'effet de l'addition, à notre solution d'hydrolyse, d'un sel neutre ayant le cation en commun avec la base, est d'abaisser le coefficient d'activité, qui est une mesure de la dissociation apparente de la base. Comme nous le voyons sur la *figure* 7, ce coefficient diminue lorsque la concentration de la base augmente, et ceci d'autant plus sensiblement que les bases sont plus faibles.

Ceci explique, au moins en partie, pourquoi l'addition de sel neutre influe moins sur la vitesse d'hydrolyse dans le cas des bases fortes que dans celui des bases moins fortes.

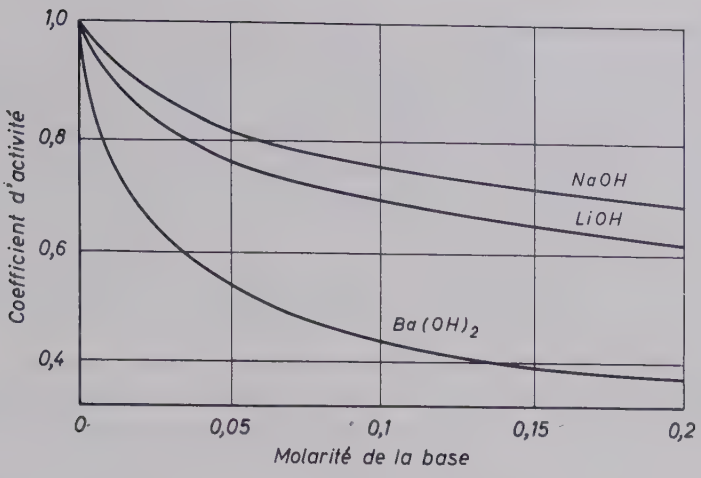


Fig. 7.

En accord avec ces considérations nous avons trouvé que l'addition d'un sel neutre de Ba, le $BaBr_2$, provoque une augmentation de la vitesse d'hydrolyse du méthyl-glucoside-4,6-phosphate, tandis que le NaCl affecte moins la vitesse d'hydrolyse du même phosphate par la soude. Les résultats que nous venons de mentionner n'ont qu'une valeur qualitative; en effet ils reposent sur l'estimation visuelle de l'intensité de taches colorées sur chromatogramme, car, l'effet de sel n'ayant pas une valeur probative absolue pour le mécanisme d'action de l'ion Ba, nous n'avons pas effectué les mesures quantitatives, longues et difficiles.

Il serait donc très tentant de supposer, commme l'a fait d'ailleurs Pfeil, que la base tout entière, c'est-à-dire non dissociée, agit comme agent catalyseur pour l'hydrolyse de nos phosphates. Il est intéressant de remarquer dans cet ordre d'idées que Martland et Robinson [197] ont proposé une hypothèse, selon laquelle la phosphatase alcaline aurait des propriétés basiques faibles qui lui permettraient de former, avec des esters phosphoriques, un complexe enzyme-substrat dont la formation serait d'autant plus facile que l'acidité de l'ester phosphorique à scinder serait grande, et qui se décomposerait, après, pour donner les produits de l'hydrolyse. Ils ont montré que l'enzyme réagit plus vite (la constante de Michælis diminue) avec les glycérophosphates qu'avec l'éthylphosphate (acide plus faible) et deux fois plus vite avec le phénylphosphate qu'avec le glycérophosphate. Les travaux plus récents de Delory et King [198] rendent l'hypothèse de Martland et Robinson probable.

A propos de l'effet de dissociation des différentes bases nous avons également étudié qualitativement l'influence du solvant sur la vitesse de la réaction d'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques. Nous avons observé que celle-ci est sensiblement plus grande dans un mélange de dioxanne et d'eau (1/1) que dans de l'eau pure. Le méthanol augmente également la vitesse de l'hydrolyse si celle-ci se fait dans un mélange de méthanol-eau. On observe donc un effet de solvant négatif.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus précédemment pour démontrer l'existence d'un effet de sel, mais ne permettent pas, non plus, d'aller plus en avant pour une définition plus précise du rôle du Ba dans l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques.

2,4-*b* **Effets de complexation.**

La dissociation incomplète de certaines bases, que nous avons prise en considération pour obtenir des renseignements sur le mode d'action catalytique de l'ion Ba dans l'hydrolyse de phosphates cycliques hexaatomiques, n'est pas une propriété des ions qui se prête facilement à l'expérimentation, car pour des systèmes compliqués comme l'est le nôtre on ne peut guère observer ses changements que par les effets de sel et de solvant.

Nous nous sommes donc tourné vers la deuxième propriété des ions qui nous semblait pouvoir expliquer au moins en partie l'effet catalytique observé, à savoir la chelation ou formation de complexes.

Une théorie simple, basée seulement sur des interactions électrostatiques, ne semble pas suffire pour expliquer la chimie des complexes cationiques en solution aqueuse. En principe, entre un cation M du groupe II_A du tableau périodique et un ligand L, en solution aqueuse il peut se former un « complexe » ou une « paire d'ions » [199] :

$$M(H_2O)_n + L \rightleftarrows M(H_2O)L \rightleftarrows ML(H_2O)_m + (n - m)H_2O,$$

Paire d'ions *Complexe*

entre lesquels il est difficile de distinguer. Calvin et Martell [200] trouvent que la stabilité du complexe chelate augmente avec la taille du cation hydraté.

Les trois facteurs essentiels qui semblent dominer la tendance à former des chelates sont :

1° *les forces interioniques* dépendant de $\frac{e^2}{r}$ (r = rayon et e = charge de l'ion); il s'est révélé avantageux de prendre $\frac{e^2}{r}$ au lieu de $\frac{e}{r}$ puisque les valeurs de $\frac{e^2}{r}$ suivent celles du rapport des constantes de stabilité, log K, dans l'ordre :

$$Mg > Ca > Sr > Ba > Li > Na \qquad ([200], p. 191);$$

2° *la tendance relative à former des liaisons homopolaires;* ainsi une diminution de l'interaction électrostatique et une augmentation des forces de répulsion peuvent être balancées par une augmentation de la covalence dans les divers complexes;

3° *les facteurs stériques :* la stabilité de certains complexes de cations petits est réduite par rapport à celle de cations plus grands, comme par exemple Mg et Ca, lorsque le nombre de positions par lequel le ligand peut se coordonner augmente.

Nous essaierons d'obtenir des renseignements sur l'interaction entre phosphates d'un côté et cations et solvant de l'autre, par des mesures de conductimétrie et d'absorption IR.

1° Mesures conductimétriques.

Nous avons pensé à mettre en évidence un éventuel complexe entre des cations et les anions des phosphates cycliques par conductimétrie. Pour qu'une réaction puisse donner lieu à un titrage conductimétrique, il faut qu'elle soit accompagnée d'une variation de conductibilité, soit que le nombre total d'ions en solution varie soit que, ce nombre restant constant, des ions de mobilité donnée soient remplacés par des ions de mobilité différente.

Nous avons ajouté une solution contenant le cation, pour lequel nous supposions une complexation, à une solution du phosphate. Après correction de volume des valeurs obtenues, nous avons dressé les courbes en portant la conductibilité en fonction de la quantité de cation ajouté. Les valeurs que nous mesurions (sur le pont LKB, type 3216 B, qui permettait de travailler avec une marge d'erreur de $\pm$ 0,1 %) étaient les résistances $R = Cr = C/\lambda$, où λ est la conductivité (conductibilité spécifique), r la résistance spécifique et C la constante de la cellule. La conductibilité λ est l'inverse de R. La température avait toujours été maintenue constante à 25°.

Les premières expériences ont été exécutées à pH = 7 en ajoutant des solutions de chlorure de baryum, de magnésium ou de potassium à des solutions de butanediol-1,3-phosphate, d'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate, les deux derniers sous forme de sel de cyclohexylammonium. Il était extrêmement intéressant de savoir si une complexation, qui se traduirait dans la courbe de conductibilité par une inflexion plus ou moins prononcée, avait déjà lieu en absence d'ions OH^- et à température ambiante. Nous n'avons pas seulement fait des expériences avec le baryum et le potassium, dont nous utilisons les cations lors de nos hydrolyses, mais aussi avec le magnésium, cation plus important dans le métabolisme animal et végétal que le baryum, dont nous attendions aussi une complexation avec les phosphates.

Nous avons trouvé que le baryum complexe très bien à pH = 7 avec l'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate (*fig.* 8) et le butanediol-1,3-phosphate (*fig* 8 *a*), le magnésium

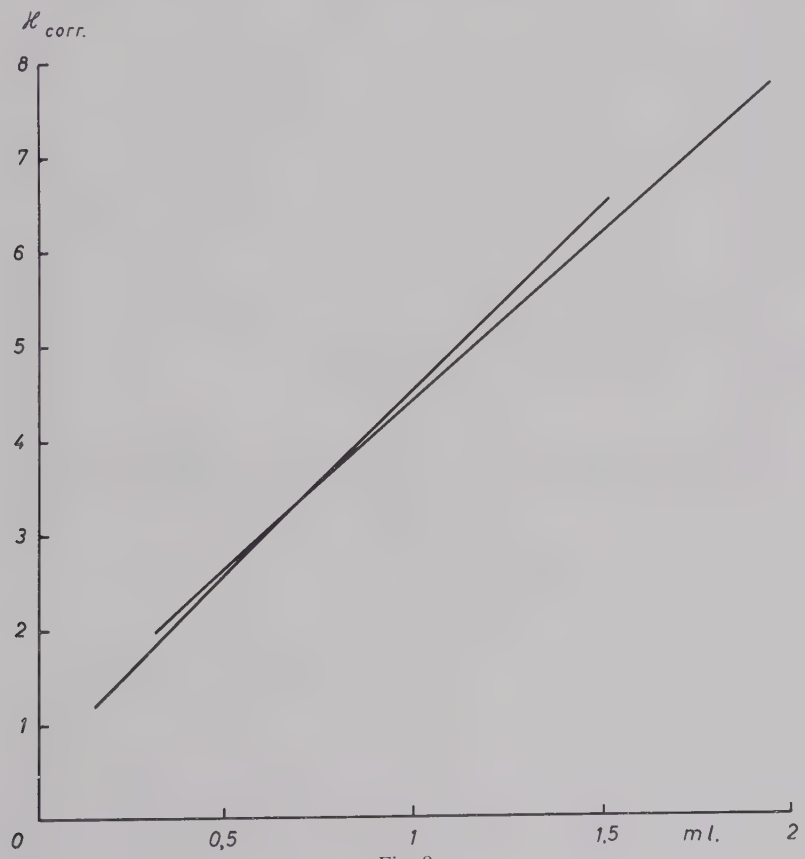


Fig. 8.

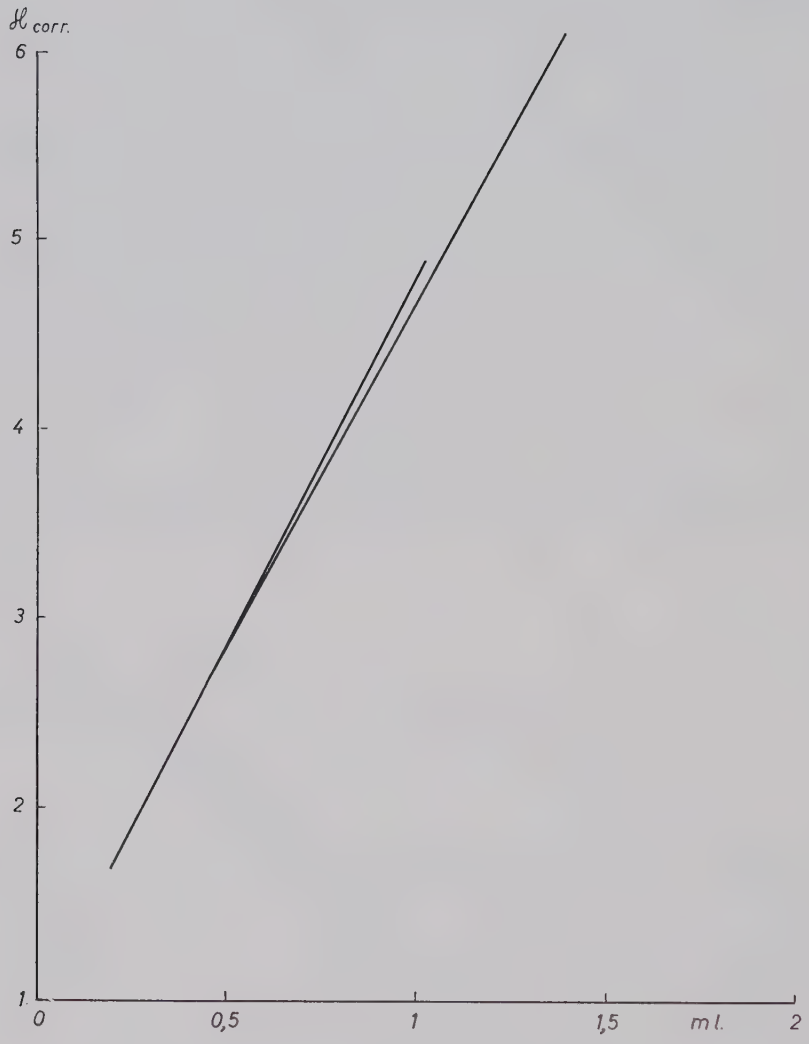


Fig. 8 *a*.

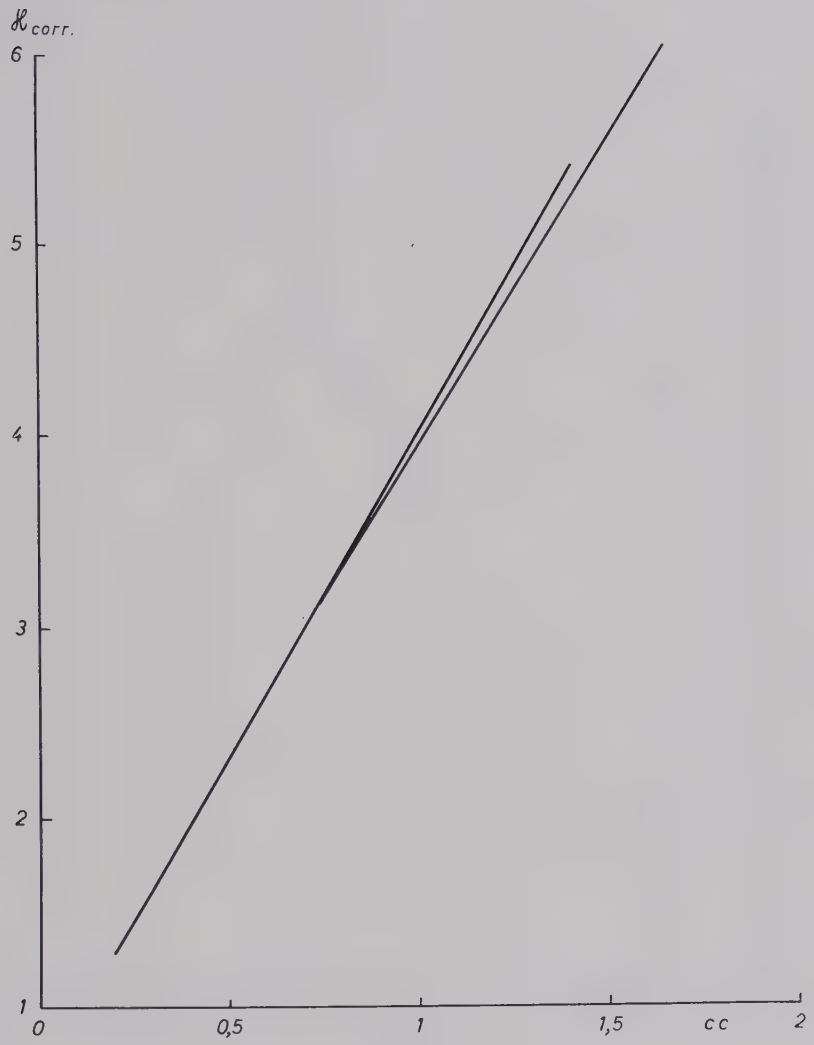


Fig. 9.

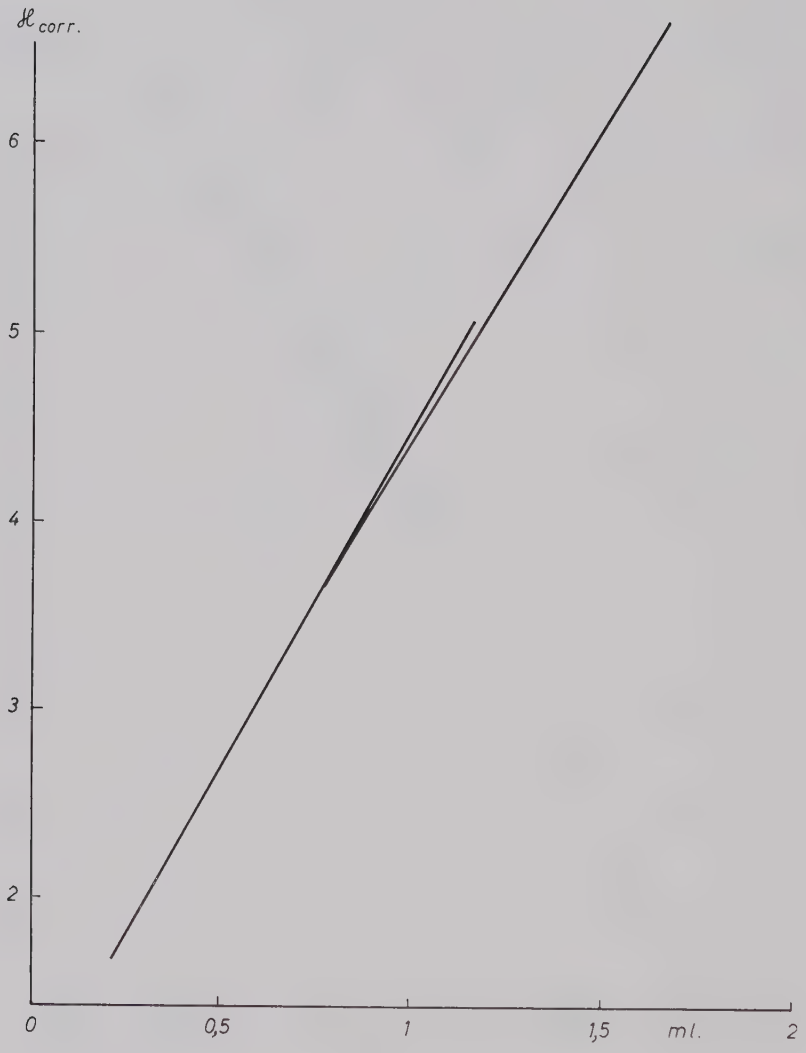


Fig. 10.

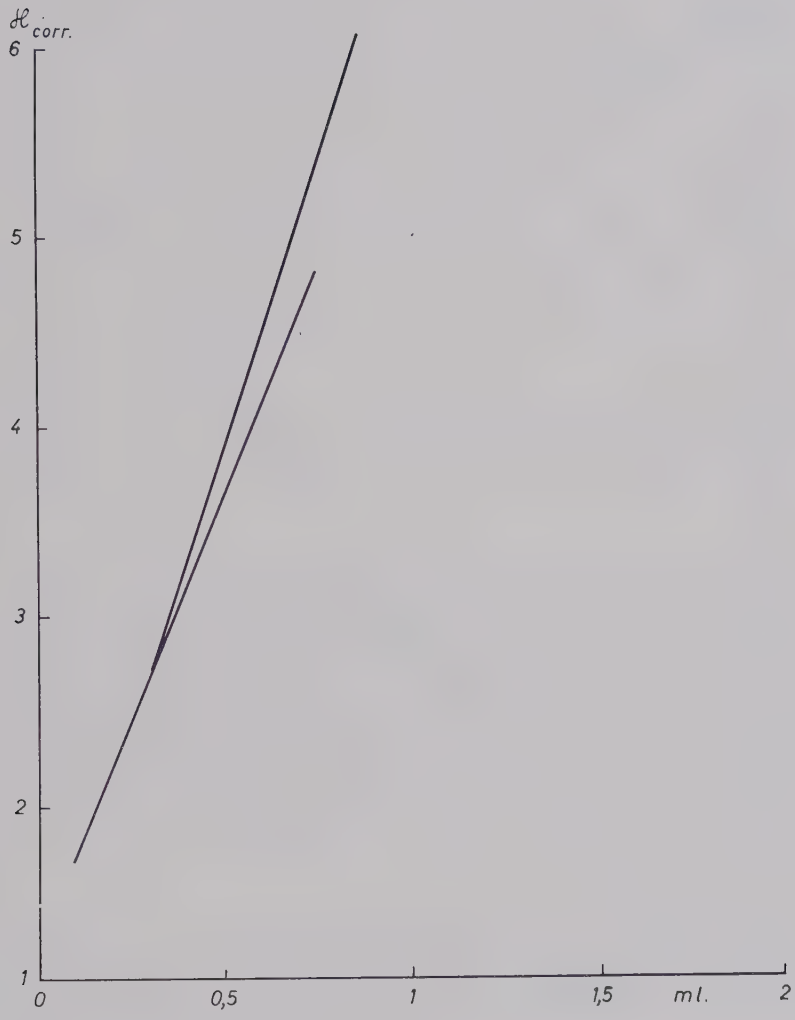


Fig. 11.

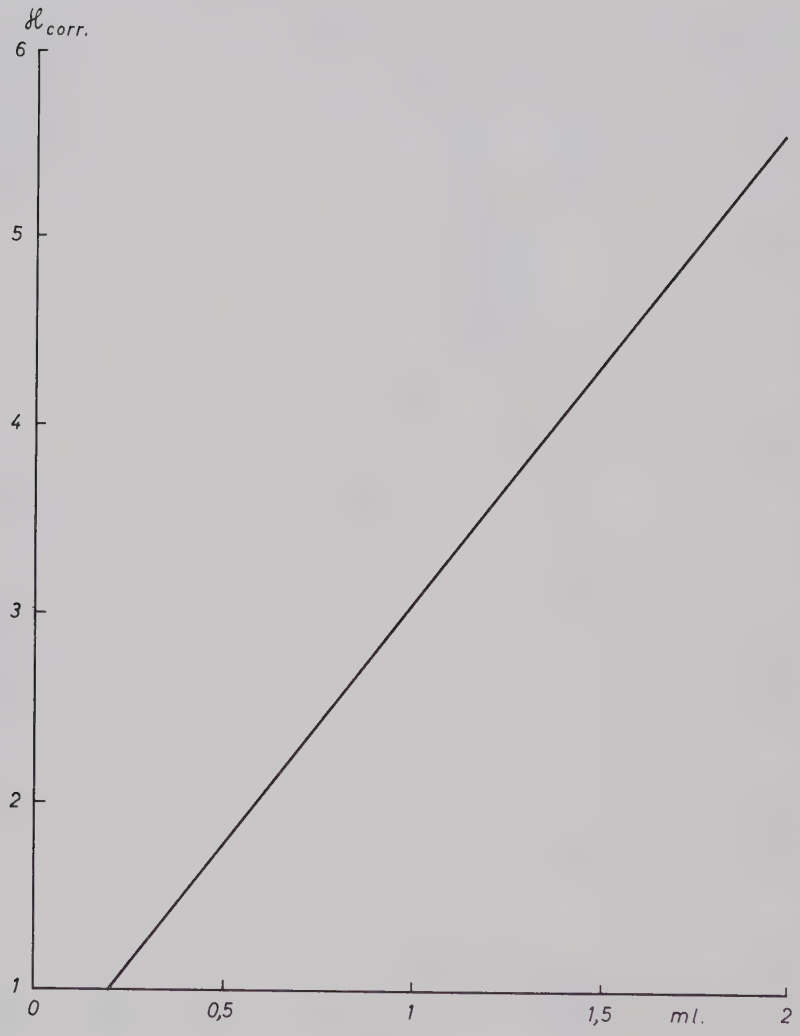


Fig. 12.

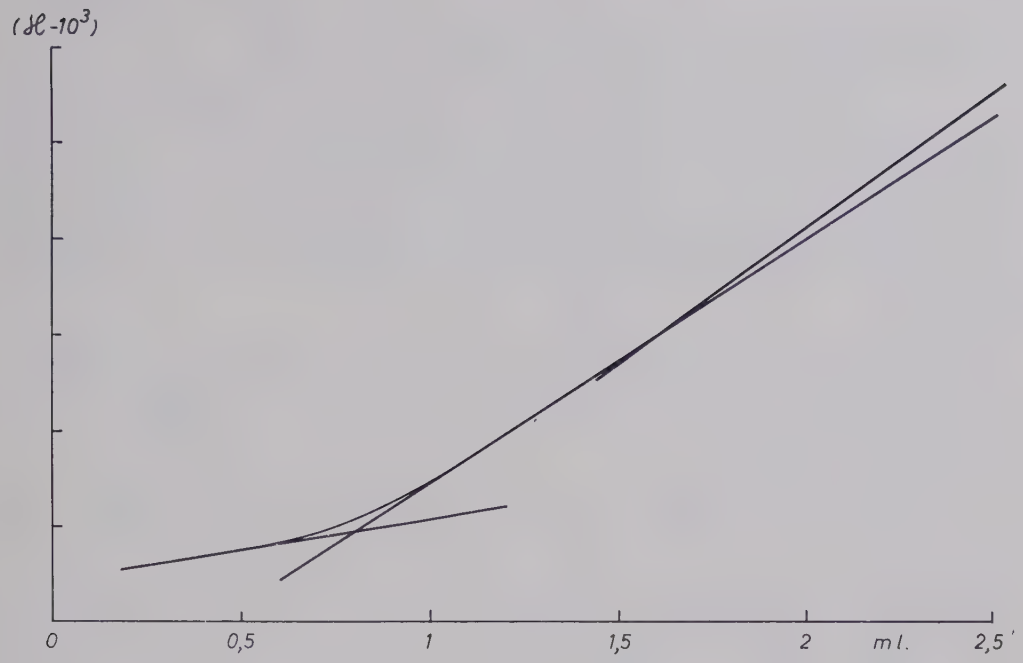


Fig. 13.

complexe très bien avec l'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate (*fig.* 9), le butanediol-1,3-phosphate (*fig.* 10) et l'α-méthyl-glucoside-6-phosphate (*fig.* 11). Tous les complexes ont le rapport phosphate /cation égal à 1 /1 et la courbe, parfaite dans son allure, s'infléchit après le point d'équivalence vers des conductibilités moins grandes, excepté celle du méthyl-glucoside-6-phosphate pour lequel la courbe, tout en étant moins parfaite que les autres courbes, s'infléchit vers des conductibilités plus grandes : nous expliquerons ce phénomène plus tard. Il est très significatif que la courbe de conductibilité pour le titrage du méthyl-glucoside-4,6-phosphate par le KCl ne montre pas la moindre inflexion (*fig.* 12).

A un pH d'environ 13 les courbes que nous avons obtenues par le titrage du phosphate cyclique avec la baryte 0,4 N, présentaient une double inflexion vers les conductibilités plus grandes, indiquant un point d'équivalence très net 1 /2 entre la baryum et le phosphate et un autre point d'équivalence beaucoup moins net pour le rapport 1 /1 entre ces deux partenaires (*fig.* 13).

A la suite de ces expériences nous pouvons donc affirmer que les phosphates cycliques hexaatomiques forment des complexes avec le baryum ou le magnésium, alors que le sodium ou le potassium n'en semblent pas former.

2° Mesures d'absorption ir.

La théorie et la technique de la spectrométrie infrarouge nous semblaient indiquées pour étudier, d'un autre côté encore, le problème de l'action du baryum, du sodium, du potassium, du cyclohexylammonium et d'autres cations dans l'hydrolyse alcaline

des esters phosphoriques. En même temps nous pensions obtenir des renseignements sur un rôle éventuel joué par le solvant (l'eau) dans cette réaction.

Il va sans dire que les fréquences et aussi les intensités des bandes varient plus ou moins selon les conditions dans lesquelles le spectre du phosphate a été pris. Ainsi par exemple, le groupe P = O libre absorbe en principe entre 1 250-1 350 cm^{-1}, tandis que ce même groupe, lorsqu'il participe à une liaison hydrogène, absorbe entre 1 150-1 250 cm^{-1}. Le spectre IR d'un phosphate solide pris sur une pastille de ce corps dans du KBr diffère aussi très sensiblement du spectre de ce même corps pris en solution aqueuse.

Les spectres que nous avons pris de nos phosphates à l'état solide ne pouvaient rien nous apprendre sur les conditions dans lesquelles intervenaient le cation et le solvant dans les réactions d'hydrolyse et nous avons essayé d'obtenir des informations en prenant ces spectres en solution aqueuse.

Le principe de la technique d'enregistrement des spectres IR en solution et à l'état solide en disque KBr est pareil. La difficulté essentielle réside cependant dans le fait que la cuve qui doit contenir la solution doit être insoluble dans cette solution et en même temps transparente pour la partie du spectre à enregistrer. Dans notre cas ces deux conditions sont remplies par la fluorine (CaF_2), qui est insoluble dans l'eau et laisse passer la plus grande partie du spectre des phosphates qui nous intéressent.

Nos spectres ont donc été pris, ou bien entre des lamelles de fluorine avec un chemin optique fixe de 45 μ, ou bien dans une cuve à épaisseur variable, sur un spectromètre Perkin-Elmer, modèle 221, avec un faisceau de référence, d'eau normale pour les solutions en H_2O, et d'eau lourde pour celles en D_2O. La concentration de ces solutions n'était pas rigoureusement identique dans tous les cas, mais elle variait relativement peu pour les solutions à comparer directement. Nous avons examiné nos solutions dans la plupart des cas à pH = 7 et dans quelques cas à des pH alcalins.

Les deux questions fondamentales à étudier étaient :

1° si l'on pouvait observer une différence entre le spectre d'un phosphate en présence de sodium d'un côté et baryum de l'autre et,

2° si le solvant exerçait une action, détectable en IR, sur la complexation des phosphates avec ces cations, action que l'on devrait pouvoir mettre en évidence en utilisant une fois l'eau normale et l'autre fois l'eau lourde.

Nous avons pris des spectres de plusieurs diesters phosphoriques cycliques et de quelques monoesters phosphoriques. Nous reproduirons ici ceux qui nous semblent les plus significatifs. Pour mieux illustrer parfois les changements intervenus d'un cas à l'autre, nous avons fait aussi des superpositions de certains spectres. L'attribution des différentes absorptions aux groupes qui en sont la cause, a été faite sur les trois spectres du butanediol-1,3-phosphate (*fig.* 14). La bande forte au-dessus de 1 210 cm^{-1} provient de la vibration de valence du groupe P = O ou plutôt de sa forme P^+-O^- [201]. Nous attribuons les vibrations d'intensité moyenne, à 1 160 cm^{-1}, et celles d'intensité faible, à 1 130 cm^{-1}, aux liaisons P-O et C-O respectivement, dans le groupe C-O-P.

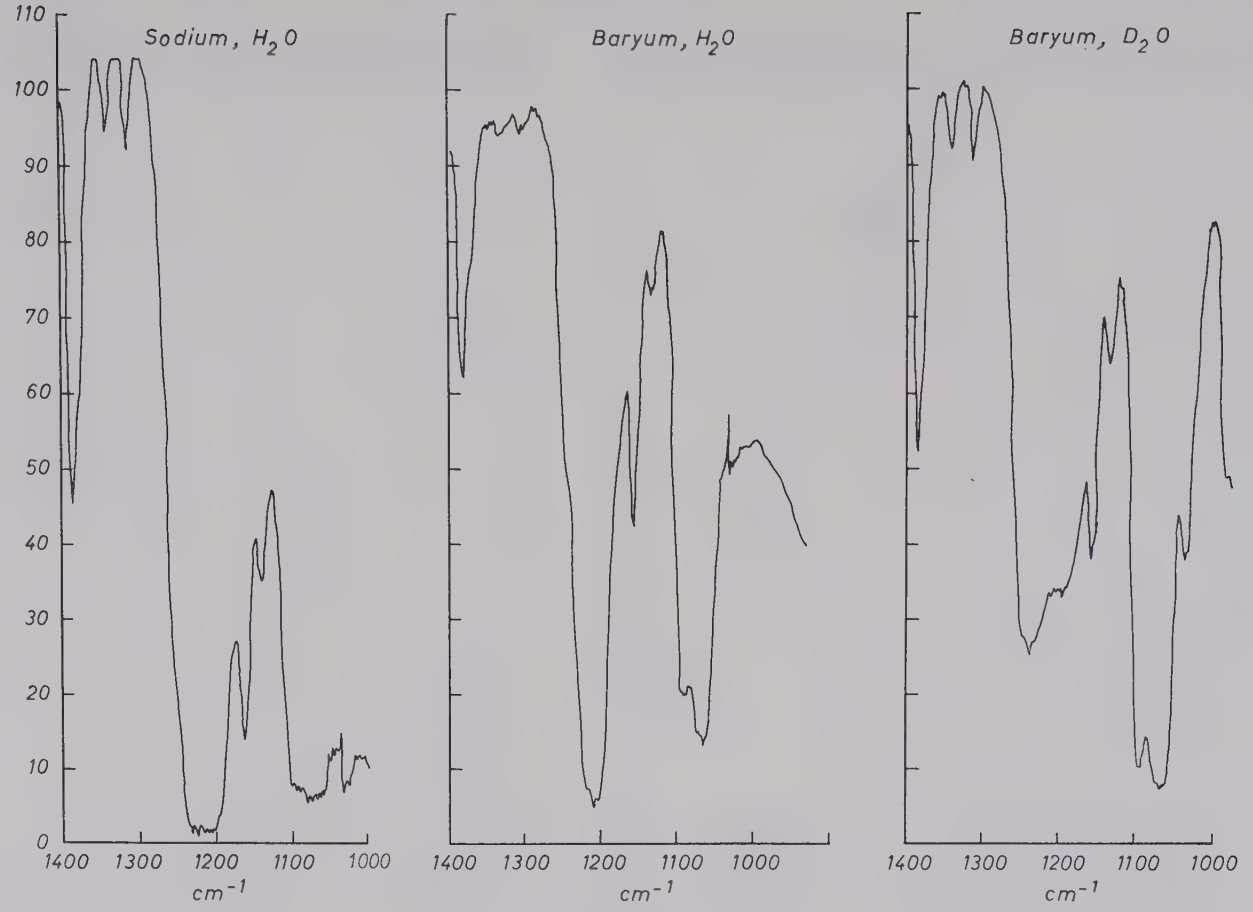

Sodium, H_2O
Baryum, H_2O
Baryum, D_2O
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1400 1300 1200 1100 1000
cm^{-1}

Fig. 14.

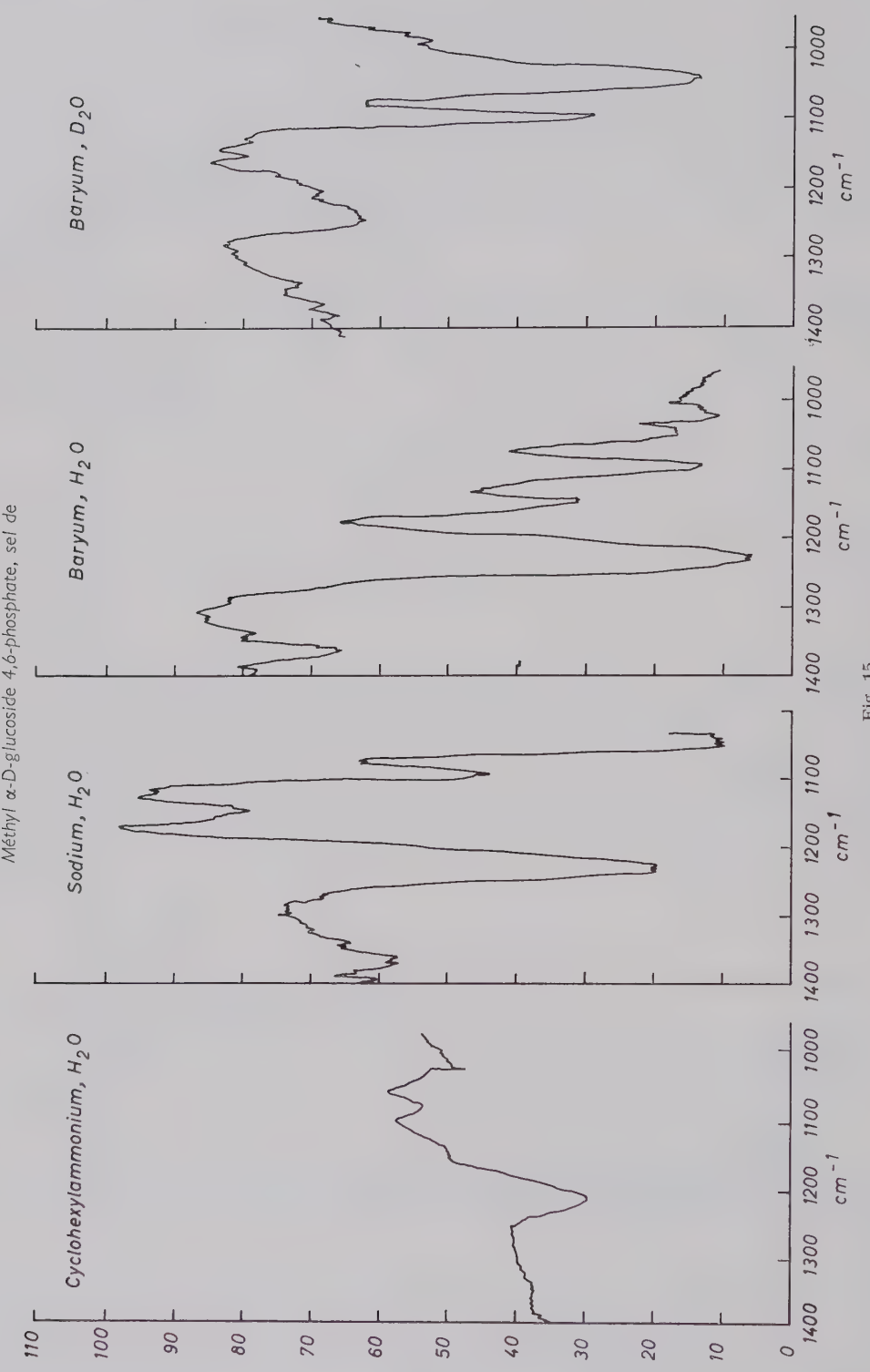

Méthyl α-D-glucoside 4,6-phosphate, sel de
Cyclohexylammonium, H_2O
Sodium, H_2O
Baryum, H_2O
Baryum, D_2O
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1400 1300 1200 1100 1000
cm^{-1}

Fig. 15.

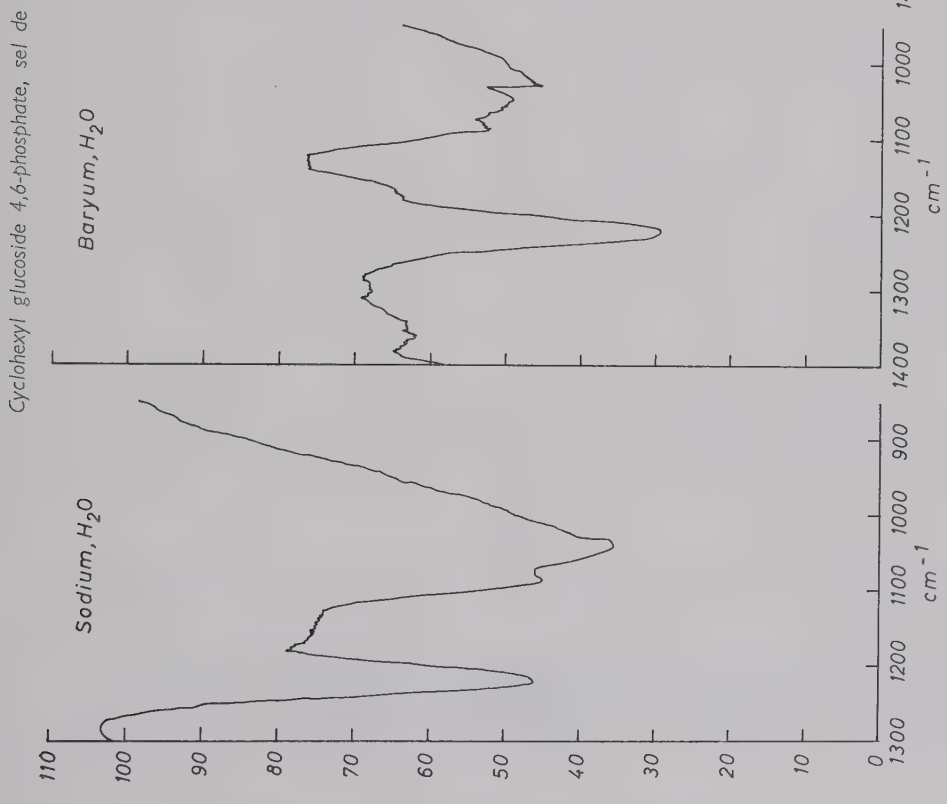

Cyclohexyl glucoside 4,6-phosphate, sel de
Sodium, H_2O
Baryum, H_2O
Baryum, D_2O
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1300 1200 1100 1000 900
1400 1300 1200 1100 1000
1400 1300 1200 1100 1000
cm^{-1}
cm^{-1}
cm^{-1}

Fig. 16.

Les absorptions fortes à 1 090 et 1 070 cm^{-1} proviennent des vibrations P-O-alcoyle et P-O-ionique respectivement.

Nous retrouverons ces absorptions plus ou moins prononcées dans les spectres qui suivent, et qui sont ceux de l'α-méthyl-D-glucoside-4,6-phosphate (sels de cyclohexylammonium, sodium et baryum dans H_2O et baryum dans le D_2O), ceux du cyclohexylglucoside-4,6-phosphate (sels de sodium et baryum dans le H_2O et de baryum dans le D_2O) et ceux du butanediol-1,3-phosphate (sels de sodium et de baryum dans le H_2O à pH = 14) (*fig.* 15, 16, et 17).

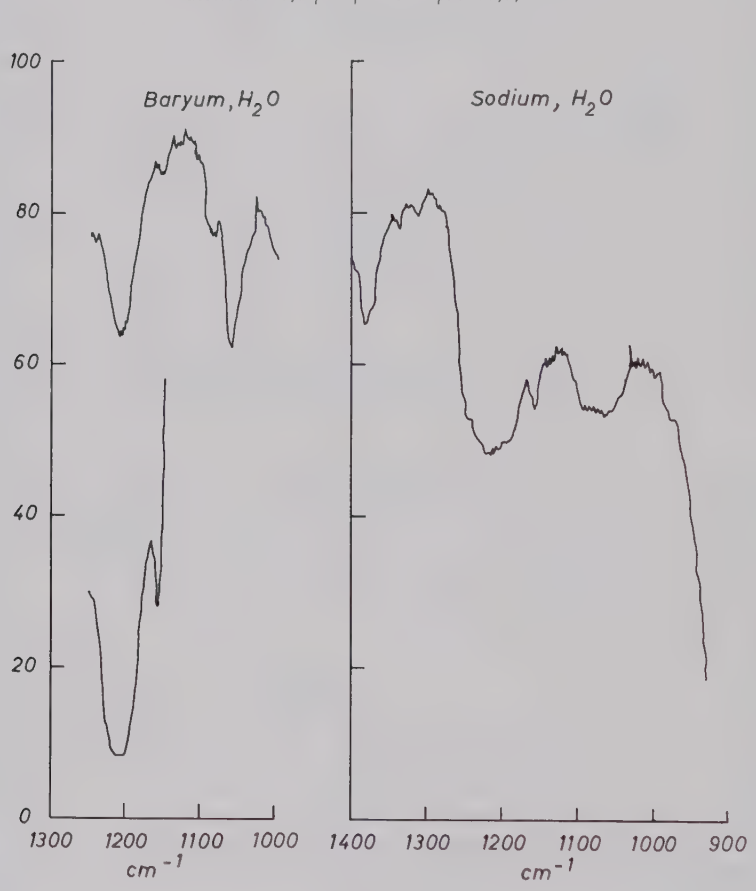


Fig. 17.

Comme l'on peut en juger d'après les spectres du glucose-1-phosphate [sels de K, Ba et K avec traces de Cu, en solution dans l'eau normale (*fig.* 18)], les absorptions de ces substances sont très différentes de celles des phosphodiesters cycliques et, comme bande d'absorption, il ne reste que la bande autour de 1 100 cm^{-1} attribuable à P-O (on peut assez bien remarquer le déplacement de fréquence provoqué par les différents cations).

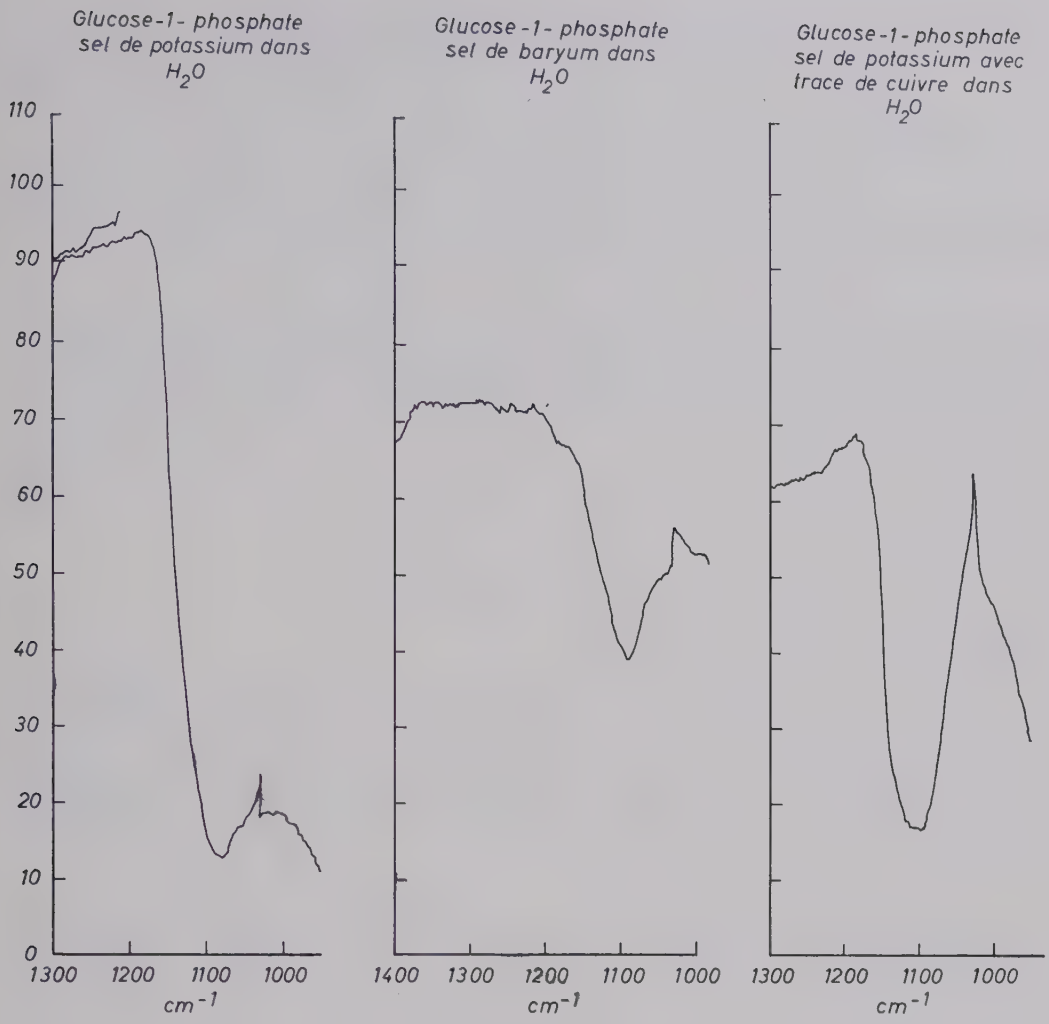


Fig. 18.

A l'observation de ces spectres, nous pouvons faire les trois constatations suivantes :

1° en passant du sel de cyclohexylammonium au sel de sodium et de baryum et en considérant la bande d'absorption du groupe P = O, l'intensité de cette bande augmente sensiblement, indiquant une polarisation plus grande de ce groupe. Les fréquences d'absorption des différents groupes restent cependant sensiblement les mêmes. Ceci à pH = 7;

2° à pH = 13-14, les fréquences d'absorption restent identiques à celles observées à pH = 7, mais les intensités des deux bandes principales sont devenues très faibles.

3° il y a une influence prononcée du solvant — en l'espèce, de l'eau — dans la formation de nos complexes, laquelle s'exprime surtout dans un déplacement aussi bien de la fréquence que de l'intensité de l'absorption.

2,5 CONCLUSIONS SUR L'EFFET IONIQUE

A la suite des résultats obtenus par des mesures conductimétriques et d'absorption infrarouge, nous pensons pouvoir expliquer l'effet ionique observé lors de nos hydrolyses alcalines par une complexation entre les cations et le phosphate. Cette complexation est forte pour le baryum et le magnésium, faible pour le sodium et le potassium — elle n'a d'ailleurs pu être mise en évidence que par les mesures en IR et non par la conductimétrie — et elle n'existe pas pour le cyclohexylammonium.

Ceci s'accorde très bien avec les résultats que Van Wazer et Campanella [202] ont obtenus à la suite de leurs expériences électrométriques sur la complexation de méta- et polyphosphates. Ils divisent les cations en trois classes en ce qui concerne leur pouvoir complexant :

1° les alkylammonium quaternaires (NR_4), qui ne forment pas du tout de complexes;

2° les alcalins, qui forment des complexes faibles, et

3° les autres métaux, comprenant les alcalino-terreux, qui forment des complexes forts, ainsi que les métaux de transition.

Ces auteurs ont trouvé un nombre de coordinations de *2* pour le sodium et de *4* pour le baryum, aux concentrations étudiées. Nous avons vu que les complexes formés par les phosphodiesters cycliques d'un côté et le baryum et le magnésium de l'autre, sont dans le rapport de 1 à 1, pour pH = 7 et de 2 à 1 ou 1 à 1 (selon la concentration relative) pour pH = 14, dans tous les cas étudiés. Nos résultats sont donc compatibles avec les résultats antérieurs.

Le solvant, en l'espèce l'eau, intervient également dans la formation du complexe. Pour entrer dans le complexe l'eau peut se fixer soit directement sur le phosphore (nous allons discuter ce point un peu plus loin) soit entre le phosphate et le cation; dans le deuxième cas il n'y aurait pas de coordination directe et le phosphate ne déplacerait pas l'eau de la sphère de coordination du cation mais s'associerait au cation hydraté.

De leur théorie sur l'association ionique Fuoss et Kraus [203] ont déduit une formule approximative pour la constante d'association K :

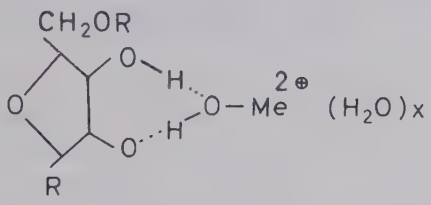
$$K = A_0 \exp\left(-\frac{z_1 z_2 e^2}{DkTa}\right), \qquad A_0 = \frac{4\pi N a^3}{3000},$$

où :

z : valence de l'ion; T : température absolue; e : charges des ions; D : constante diélectrique; a : distance entre les centres positifs et négatifs du complexe; k : constante.

Pour des sulfates [204], [205] et pour l'ATP [206] pour lesquels ce genre de complexes ont été postulés, la constante K a été déterminée, puis la distance a calculée, utilisant cette formule. Ces calculs ont donné des valeurs situées entre 5 et 6 Å, c'est-à-dire des valeurs qui correspondent assez bien à la distance entre le cation hydraté et le ligand.

Le même genre de complexe a été indiqué par Brintzinger [207] pour des ribotides, où il y aurait association entre le groupe diol-2,3-du ribose et des ions métalliques, par l'intermédiaire de ponts hydrogène :



Ce type d'association ionique semble donc tout à fait possible et dans notre cas il paraît, au vu de nos résultats, le plus probable, sans que soit exclue, d'ailleurs, en même temps, une association de l'eau sur le phosphore et ceci d'autant plus que le pH augmente.

3. DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS, PROPOSITION D'UN MÉCANISME DE RÉACTION

Les résultats de nos mesures d'incorporation d'oxygène-18 lors des hydrolyses des cycles phosphoriques à six membres nous ont montré que la rupture du cycle se faisait entre P et O et qu'un atome de ^{18}O était incorporé dans le radical phosphoryle.

Comme l'attaque initiale du nucléophile doit nécessairement avoir lieu sur le phosphore, nous nous sommes intéressé de plus près non seulement à la façon de réagir du phosphore dans quelques autres de ses composés, mais aussi à celle des éléments entourant le phosphore dans le système périodique de MENDELEEV et MEYER. A cet égard le comportement de l'azote, du soufre et du silicium, voisins immédiats en haut, à droite et à gauche du phosphore dans ce système, est particulièrement intéressant : il peut aider, par comparaison avec des réactions analogues de ces éléments, à interpréter nos résultats.

Les esters de l'acide nitrique sont hydrolysés de préférence par rupture C-O en milieu alcalin [208], [209].

En ce qui concerne les esters sulfoniques, on observe une scission C-O dans la majorité des cas lorsque le carbone de la liaison C-O-S est celui d'un groupe alcoyle [210]. Ceci est d'ailleurs manifeste, puisque le diméthylsulfate est employé couramment comme agent alkylant. La situation change dans le cas des arylsulfates, qui se scindent par attaque du OH sur le soufre [212], [213]. Il semble qu'une attaque nucléophile sur un carbone aromatique soit assez difficile, comme le montre d'ailleurs l'hydrolyse des halogenobenzènes.

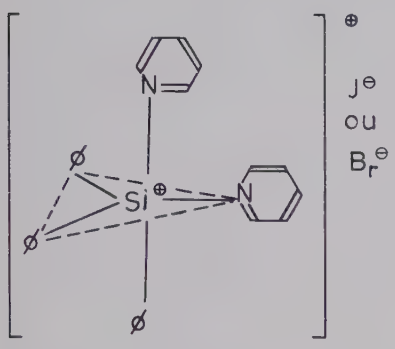
L'hydrolyse des sulfites cycliques -1,2 ou -1,3 se fait toujours, en milieu aussi bien acide qu'alcalin, par rupture S-O. Une particularité intéressante est qu'en milieu alcalin, comme pour la série des phosphates, la réactivité des 1,2-sulfites est plus grande que celle des 1,3-sulfites, tandis qu'en milieu acide l'inverse semble être le cas : et la stabilité de l'acide conjugué du cycle à six membres est plus petite. Aussi le diéthylsulfite s'hydrolyse-t-il en milieu acide plus facilement que le 1,2- ou le 1,3-sulfite.

Les sulfates cycliques à cinq membres bâtis sur le cyclohexanediol, s'hydrolysent par rupture S-O en milieu alcalin et par rupture C-O en milieu acide, tandis que pour les monosulfates formés c'est le contraire, puisqu'ils s'hydrolysent en milieu alcalin par rupture C-O et en milieu acide par rupture S-O [213]. Nous n'avons pas trouvé d'exemples de comportement pour les esters sulfuriques hexaatomiques lors de l'hydrolyse.

Il est évident que les possibilités de réaction des éléments de la deuxième période du système périodique sont beaucoup plus grandes à cause de leur diamètre et de leur polarisabilité plus grande. Ainsi, il paraît tout naturel, lors de certaines réactions, que ces éléments élargissent leurs couches électroniques extérieures pour passer par un état de transition contenant 10 où même 12 électrons dans la couche de valence, si les conditions extérieures (tension de la molécule provoquée par des cycles bâtis sur l'élément central, électronégativité des ligands, effets du solvant, effet des cations

éventuellement présents, effets stériques, etc.) le permettent. Ces facteurs doivent jouer tous ou en partie pour compenser l'énergie nécessaire pour faire entrer en jeu les niveaux *d* de l'élément central.

L'exemple du silicium est très significatif. On a postulé pour lui un état de transition pentacovalent lors de certaines de ses réactions de déplacement, ayant remarqué que ces réactions étaient très souvent beaucoup plus rapides que celles du carbone [214]. Ainsi, récemment, le groupe de travail de Sommer retient la notion d'un état de transition Si(5) ou même Si(6) pour pouvoir expliquer la variété de résultats stéréochimiques obtenus sur cet élément, surtout lors des réactions du silicium en tête de pont, comme dans le 1-chloro-1-sila-bicyclo-(2,2,1)-heptane [215], [216], [217]. Le premier composé de l'ion siliconium pentacovalent : l'iodure de triphénylbipyridyl-siliconium, a en effet pu être obtenu et même cristallisé par West et Corey [218].



En ce qui concerne le phosphore, nous voudrions rappeler certaines de ses propriétés fondamentales pour expliquer les résultats que nous avons obtenus. Il importe surtout de connaître la stabilité relative des diverses formes du phosphore à coordination différente et la force relative des liaisons du phosphore. Pour cela il est indispensable d'en connaître le caractère ionique et le caractère de liaison π.

La configuration électronique du phosphore est :

$$1s^2\,2s^2\,p^6\,3s^2\,p^3.$$

Dans la couche de valence du phosphore se trouvent donc cinq électrons qui entrent en jeu lors des réactions chimiques de cet élément. Pour les composés du phosphore on peut écrire cinq *structures de base* selon la répartition stérique des électrons hybridés (*fig.* 19) :

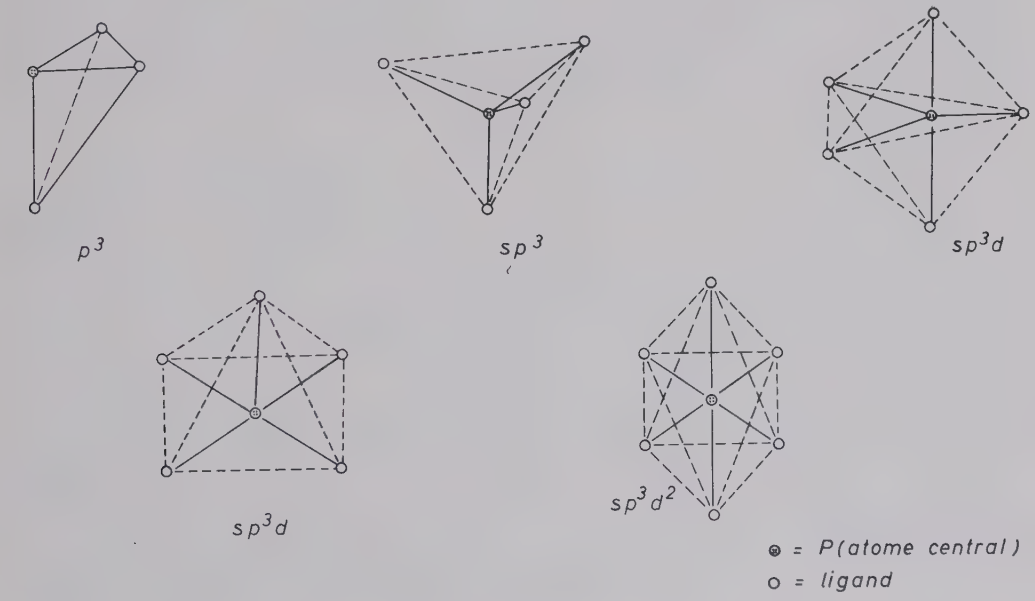


Fig. 19.

— le p^3, qui a un peu de caractère sp^3 (orthogonal-trigonal),
— le sp^3, forme *tétraèdre*;
— le $sp^3\,d$, forme *bipyramide trigonale* ou *pyramide carrée;*
— le $sp^3\,d^2$, forme bipyramide tétragonale *(octaèdre).*

On trouve en général que pour les hybrides qui n'apportent pas une contribution correspondante à un nombre entier d'électrons *s*, *p* ou *d*, la forme stérique du composé sera celle du plus proche hybride avec un nombre entier d'électrons. Il est connu que des liaisons π interviennent également pour les composés du phosphore, mais les molécules dans lesquelles le phosphore n'a que trois ligands ne semblent pas avoir de caractère π. Il n'en est pas de même pour les molécules dans lesquelles le phosphore est lié à quatre autres atomes, c'est-à-dire où il y a quatre ligands. Ici, pour chaque liaison entre le phosphore et le ligand, il y a entre 2 dixièmes et 5 dixièmes de liaison π, ce qui ferait un total de 1 à 2 liaisons π par molécule. Si l'on passe d'un phosphore tétracoordonné à un phosphore penta- ou hexacoordonné, la quantité de liaisons π devient à nouveau très petite et l'on observe même des valeurs négatives, ce qui pourrait indiquer qu'il n'y a même pas une liaison formelle entière entre le phosphore et chacun de ses ligands [219]. Si nous voulons généraliser, nous pouvons dire que dans les composés dans lesquels le phosphore a trois ligands, les liaisons entre ces ligands et le phosphore sont des liaisons σ presque pures. Lorsque le phosphore a quatre ligands, il y a quatre liaisons σ avec une liaison π environ par phosphore, et pour un phosphore avec cinq ou six ligands, il y a moins de cinq ou six liaisons σ entre le phosphore et ses ligands, avec apparemment très peu de liaisons π.

Les raccourcissements des liaisons (en Å) qui sont une expression directe du caractère d'une liaison π, peuvent être tirés d'une courbe qui a été établie d'après des calculs faits par Pauling [221], dans l'hypothèse que le rapport des constantes de force de la liaison simple, double et triple est de 1, 3, 6 et que le raccourcissement dû à π_y seul est de 0,19 Å et celui de $\pi_y + \pi_z$ est de 0,30 Å (*fig.* 20).

Dunitz et Rollet [221] avaient déjà trouvé, par des mesures au rayons X sur des cristaux d'acide dibenzylphosphorique, que les liaisons P-O dans cet ester

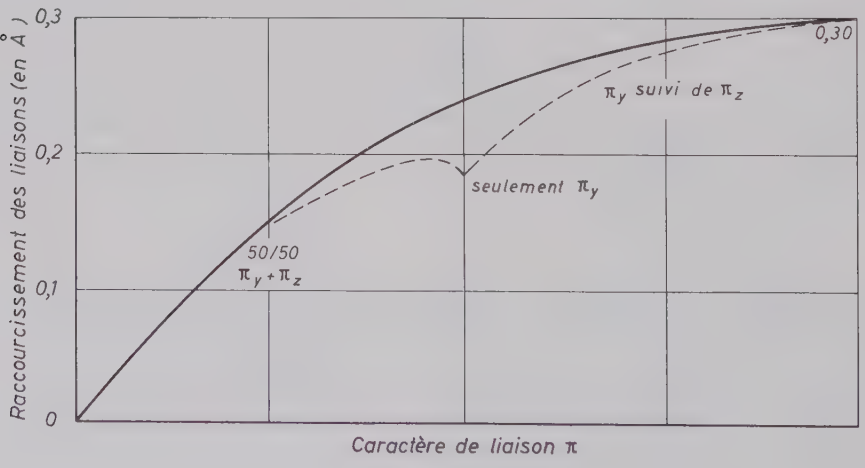


Fig. 20.

(1,55 Å pour les trois P-O et 1,47 Å pour le P = O) étaient plus courtes de 0,3 Å que ne l'indiquait le calcul fait à partir des rayons covalents de P et O (1,10 et 0,74, respectivement [223]). La longueur des liaisons C-O était de 1,46 Å et l'angle C-O-P, 120°, l'angle O-P-O le plus petit (104°) étant celui qui existe entre les deux oxygènes estérifiés et entre un oxygène estérifié et le groupe OH, tandis que le plus grand angle (117°) est formé par le groupe OH et le groupe =O.

Craig et al. [223], Jaffe [224], [225] et Lippincott [226] ont montré, par des calculs basés sur la mécanique quantique, que les raccourcissements observés peuvent être attribués à des liaisons p_π-d_π, et que la force de telles liaisons devrait être relativement peu influencée par la différence d'électronégativité des atomes qui forment la liaison. L'existence de ces liaisons π dans les sp^3-hybrides des éléments de la deuxième période semble être un phénomène général, comme l'ont montré Stone et Seyferth [227] pour les orbitales d_π du silicium.

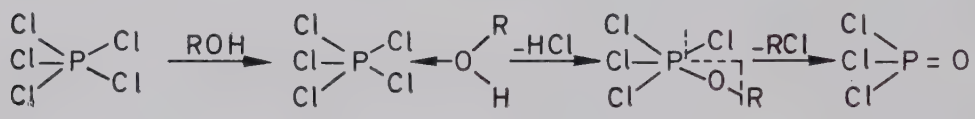
Une liaison entre le phosphore et un ligand possède un caractère ionique plus ou moins développé, selon la différence d'électronégativité entre les deux atomes : la présence de liaisons π réduit cependant considérablement le caractère ionique des liaisons dans une molécule (« feedback ») [220]. Il est probable que les liaisons π stabilisent le phosphore tétracoordonné, tandis que cette stabilisation ne s'offre pas aux composés tri- ou pentacoordonnés [219].

Les éléments de la deuxième période surtout Si, P et S, sont capables d'utiliser des orbitales *d*, bien que celles-ci aient une énergie plus élevée que les orbitales *s* et *p*. Des composés comme SiF_6^{--}, PF_5 et SF_6 en témoignent.

Le phosphore montre des réactions qui semblent être apparentées aux réactions connues pour le carbone et qui, par conséquent, peuvent être décrites en utilisant la nomenclature développée pour les mécanismes de réaction du carbone. Il ne faut cependant pas pousser trop loin l'analogie entre ces deux éléments de deux périodes différentes, dont le premier non seulement est plus grand que le deuxième et montrera donc moins d'encombrement pour des groupes qui l'attaquent, mais qui a aussi la possibilité d'élargir sa couche de valence, puisqu'il fait partie de la deuxième période pour laquelle la règle de l'octet électronique n'est plus strictement valable. Ce dernier aspect est extrêmement important et il rendra possible une explication de nos résultats expérimentaux.

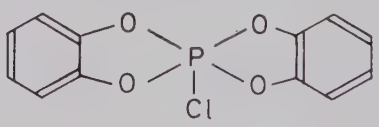
Les groupes partants dans nos réactions d'hydrolyse sont des groupes dont les acides conjugués ont un pK_a assez élevé; ce sont donc des groupes difficilement scindables. Pour les composés du carbone, de telles réactions d'hydrolyse catalysées par des bases fortes sont même inconnues, exception faite pour les réactions des époxydes cycliques. Il serait donc à prévoir qu'un mécanisme d'un ordre différent entre en jeu pour que ce genre de réaction puisse avoir lieu sur le phosphore, mécanisme qui n'a pas été observé jusqu'ici pour les composés du carbone. Ce mécanisme devrait surtout faciliter le départ du groupe sortant avec la paire d'électrons de liaison, ce qui implique que son état de transition doit être assez riche en électrons sur le phosphore; ces électrons doivent à leur tour venir de l'espèce nucléophile attaquante. Nous allons voir que l'explication que nous donnons des phénomènes, que nous avons observés et mesurés, devient encore plus plausible à la lumière de ces impératifs et que surtout l'action catalytique du Ba peut très bien s'expliquer par le fait qu'il facilite beaucoup l'activation du phosphore par l'attaque des ions OH^-.

Depuis que Pauling [228] a introduit la notion de l'hybridation des orbitales atomiques, la présence de niveaux *d* dans ces hybriques a été discutée. Pour expliquer l'hydrolyse ou l'alcoolyse des composés polyhalogénés du carbone, du silicium, du phosphore et du soufre, Hückel [229], s'appuyant sur la théorie de Pfeiffer [230], a postulé que, lorsque l'addition sur une liaison n'est pas possible, comme c'est le cas de la plupart des composés des éléments cités, et qu'il n'y a pas non plus deux électrons isolés comme dans le cas du PCl_3, l'hydrolyse est rendue possible par un élargissement de la couche électronique de valence. Le $SiCl_4$ subit facilement une alcoolyse en milieu neutre, alors que le CCl_4 est difficilement attaqué même par les ions alcoyloxy, car le Si élargit plus facilement sa couche électronique que ne le fait le carbone. L'hydrolyse du PCl_5 se fait aussi par élargissement de la couche électronique jusqu'à hexavalence du phosphore :



Le comportement différent des hydroxydes de phosphonium et des hydroxydes d'ammonium, lors de la pyrolyse, où les premiers donnent un alkane plus l'oxyde de phosphine, tandis que les deuxièmes donnent un alkène, de l'eau et une amine tertiaire, peut s'expliquer aussi par le fait que les premiers passent par un complexe activé pentacoordonné.

Depuis longtemps, divers auteurs pensaient avoir trouvé des composés de l'acide hypothétique $P(OH)_5$ [176], [177]. Autenrieth et Meyer [231] pensent avoir trouvé un composé de l'acide thiolphosphorique $(OH)_4P(SH)$, le $(C_6H_5NH)_2$ $(C_6H_5O)P(OH)SH$ et Anschuetz et Emery [232] ont découvert, en 1887, les composés $C_6H_5O.PCl_4$ $(C_6H_5O)_2PCl_3$ et $(C_6H_5O)_3PCl_2$. Un composé ressemblant aux spirocyclanes a été également préparé par Anschuez [177], le dipyrocatécholphosphor-monochlorure : sur ce composé un nouveau travail vient de paraître, qui indique que, comme dans le cas du SF_4 ou du PCl_5, la réaction passe par un état utilisant des orbitales *d* [233], [234].



Wittig et al. [235], [236], [237], [238] ont préparé par synthèse déjà en 1949, des organopentaphosphoriques tels le $P(Ph)_5$, pour lesquels ils ont prouvé qu'il s'agit de composés entièrement covalents, comme d'ailleurs pour le $Sb(Ph)_5$ et le $As(Ph)_5$. La stabilité augmente dans le sens $P(Ph)_5 < As(Ph)_5 < Sb(Ph)_5$ et l'antimoine pourrait même former un dodécet électronique [236].

Un état de transition sp^3d pour des réactions de déplacement sur le phosphore a aussi été postulé par Green et Hudson [239].

Nous considérons donc que l'existence de composés stables, ou d'intermédiaires de réaction, à phosphore pentavalent, peut être admise.

Un des arguments majeurs contre l'utilisation d'orbitales *d* d'éléments de la première ou deuxième période pour la formation de molécules plus ou moins stables,

était le niveau d'énergie trop élevé de ces orbitales par rapport aux orbitales *s* et *p* correspondantes. Un autre en était que les orbitales *d* étaient beaucoup trop diffuses pour pouvoir former des liaisons utiles. Quant au deuxième argument, on pense maintenant que les orbitales *d* se contractent sur l'atome central à la suite des perturbations causées par les ligands [240].

En ce qui concerne le premier argument invoqué contre l'élargissement des couches de valence il faut dire que les énergies de promotion pour atteindre les divers états de valence ont été calculées pour l'atome libre surtout à partir de données spectroscopiques. Bien que des valeurs directes d'énergies de promotion pour des atomes combinés ne soient pas connues, on peut tout de même dire que celles-ci doivent être assez différentes de celles de l'atome libre. Il semble donc que l'énergie de formation des états électroniques plus élevés soit compensée, au moins en partie, par la formation de liaisons supplémentaires. Dans ce sens témoignent aussi les exemples cités plus haut que l'existence d'arrangements stériques particuliers que l'on arrive très bien à expliquer par une hybridation avec des orbitales *d*. Ainsi s'explique la bipyramide trigonale du PCl_5 et PF_5 dont Rouault [241] a déduit l'existence de mesures de diffraction électronique, postulat que Wilmshurst et Bernstein [242] ont confirmé par des mesures IR (en état gazeux et en solution dans le CS_2) et Raman (en solution dans le benzène); l'arrangement carré des liaisons équivalentes dans $(ICl_4)^-$ (Mooney [243]; la pyramide tétragonale du IF_5 [244], et surtout celle des pentaphényl-phosphore, -arsène et antimoine [245] [où des mesures aux rayons X et des moments dipolaires ont montré aussi que l'antimoine et, vraisemblablement aussi le phosphore et l'arsenic, est situé dans la bipyramide tétragonale (octaèdre)] du SF_6 [246] (Brockway et Pauling) et la bipyramide pentagonale pour le IF_7 [244].

Il semble que les états de valence supérieurs du phosphore et du soufre puissent être stabilisés seulement par des ligands assez électronégatifs, tels le fluor, le chlore ou l'oxygène, qui semblent diminuer l'énergie, c'est-à-dire stabiliser certaines formes d'hybridations entre des orbitales *s*, *p* et *d* du soufre ou du phosphore.

Il nous semble qu'à la lumière des preuves qui militent en faveur de l'utilisation de niveaux *d* dans les divers éléments cités, il est hors de doute que le phosphore puisse élargir son cortège électronique à dix ou même à douze. Une confirmation est apportée par les travaux de Gillespie et Nyholm [247], Linnett et Melish [248], et de Gillespie [249], [250], [251], selon lesquels la couche *M* qui peut abriter théoriquement neuf paires d'électrons, n'en abrite, en conséquence du principe d'exclusion de Pauli, que six paires au maximum, que ces paires d'électrons soient appariées ou célibataires (« bonding » ou « non-bonding »). La localisation la plus probable de ces électrons (qui occupent toute la place disponible dans la couche *M*), est aux extrémités d'un octaèdre, c'est-à-dire qu'ils occupent six segments d'une sphère qui entoure le noyau et les couches intérieures; ils sont dirigés vers les six extrémités de l'octaèdre. Ce sont les orbitales sp^3d^2 de la théorie du « valence-bond ».

Les substitutions nucléophiles sur le phosphore semblent donc pouvoir se dérouler selon plusieurs mécanismes-limites. De ces mécanismes, trois nous semblent les plus importants, mais il peut y avoir, évidemment, des mécanismes intermédiaires entre ces trois-là :

1° un mécanisme passant par l'intermédiaire d'un ion phosphonium, dont la réaction de PERKOW, c'est-à-dire la formation d'un ester énolphosphate à partir d'un triphosphite et d'un composé α-halogéno-carbonyle, constitue un exemple [252]. Un autre exemple est la réaction de WITTIG [253], [254].

2° un mécanisme où dans l'état de transition les liaisons du phosphore vers le groupe entrant et sortant, comparé aux autres trois liaisons, seraient plus longues et plus faibles, et qui ressemblerait au mécanisme classique S_N2. DOSTROVSKY et HALMANN [255] ont trouvé que la solvolyse et la réaction de déplacement d'anions tels que le F^-, EtO^-, PhO^-, etc., dans l'éthanol avec le di-isopropyle-phosphorochloridate se font par un tel mécanisme.

3° un mécanisme dont l'état de transition, ou l'état intermédiaire, comporte un P(5) ou éventuellement un P(6), c'est-à-dire où le phosphore comporte cinq ou six liaisons simples, qui utiliseraient des orbitales $sp^3\,d$ ou $sp^3\,d^2$. Les réactions d'hydrolyse que nous avons étudiées passent par un tel état de transition.

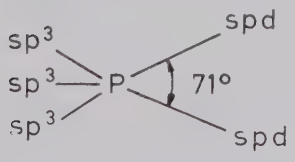
La structure d'un composé pentacoordonné dépend du niveau d qui participe à l'hybridation. Dans le langage de la théorie du « valence-bond », la géométrie d'un tel composé peut être exprimée comme une géométrie de plusieurs associations d'orbitales $sp^3\,d$. Il y a cinq orbitales d pour le phosphore, lesquelles sont dégénérées entre elles et sont, selon la notation employée par EYRING, WALTER et KIMBALL [256].

$$d_{z^2},\quad d_{xz},\quad d_{yz},\quad d_{xy},\quad d_{x^2-y^2}.$$

Selon que l'on hybride maintenant les orbitales sp^3 avec une orbitale d_{z^2}, d_{xy} ou $d_{z^2-y^2}$, on obtient des formes géométriques différentes :

— pour d_{z^2} avec une orbitale p_z on obtient un hybride pd et la forme de l'hybride sp^2pd est la *bipyramide trigonale.*

Si l'orbitale $d_{x^2-y^2}$ est choisi, l'on obtient une *pyramide carrée,* et l'hybridation de sp^3 avec une orbitale d_{xy} donne une forme géométrique où deux liaisons spd sont dirigées en direction de deux axes qui forment un angle de 71° entre eux :



Comme nous l'avons déjà mentionné, seules la bipyramide trigonale et la pyramide carrée ont pu être mises en évidence. GILLESPIE [257], [258], considérant la théorie des répulsions des électrons de valence par forces électrostatiques et forces de PAULI, a prouvé la logique de ces deux formes de la manière suivante :

— cinq paires d'électrons, qui sont à la même distance du noyau, peuvent être imaginées comme des petits points sur une sphère (*fig.* 21).

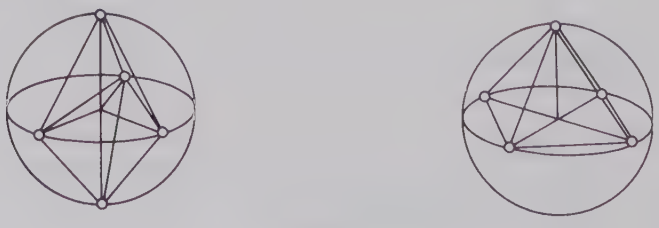


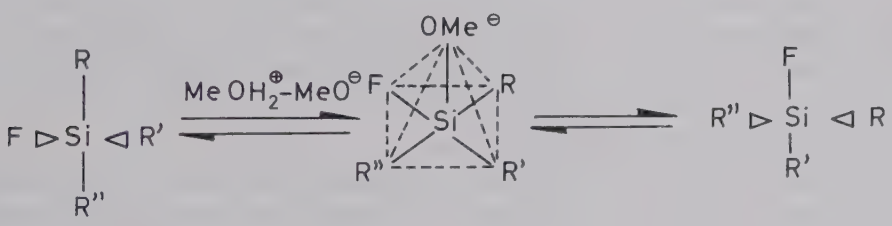
Fig. 21.

Ces électrons se repoussent selon une loi qui a la forme $\frac{1}{r^n}$ (r = distance entre deux paires d'électrons). Pour le cas où n tend vers l'infini, l'arrangement le plus stable sera atteint lorsque la distance entre toutes les paires sera la plus grande possible. Si n prend une valeur plus petite, le plan basal de la pyramide descend en-dessous de l'atome central. Gillespie [258] postule également que les paires d'électrons axiales (apicales) sont soumises à une répulsion plus grande que les paires équatoriales. Par conséquent, l'atome central doit avoir un rayon plus grand dans la direction axiale, et il prouve par des mesures que ceci est vrai dans quinze cas étudiés, le rapport $r_{ax}/r_{éq}$ étant de 1,1-1,2. Cotton [259], par un raisonnement basé sur les intégrales de recouvrement (« overlap-integrals ») a montré également que, pour une bipyramide trigonale, les liaisons axiales seraient moins fortes que les liaisons équatoriales. Craig et al. [240], admettant que l'énergie d'une liaison est proportionnelle à son intégrale de recouvrement (ce qui peut être considéré comme un peu arbitraire), sont arrivés à un résultat semblable.

Ces résultats théoriques ont été confirmés par les travaux de Rouault [241], qui a mesuré la longueur des liaisons P-Cl dans le PCl_5 par la méthode de la diffraction d'électrons (P-Cl_{ax} = 2,19 Å et P-$Cl_{éq}$ = 2,04 Å), et par Wilmshurst et Bernstein [242], qui ont calculé à partir du spectre de vibration du PCl_5 les constantes de force pour la vibration de valence des liaisons axiales ($1{,}80 \cdot 10^5$ d/cm) et équatoriales ($2{,}89 \cdot 10^5$ d/cm). Il ressort de ce qui précède que les liaisons axiales sont moins fortes que les liaisons équatoriales. Ceci a été également confirmé récemment par les travaux de Mutterties, Mahler et Schmutzler [260].

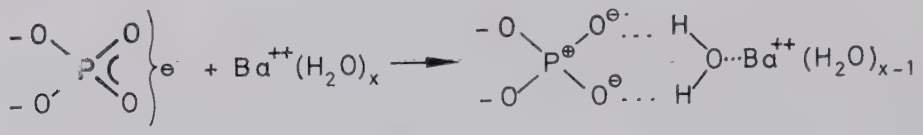
En ce qui concerne la pyramide carrée, nous supposons, par analogie avec les réflexions de Gillespie, que la liaison axiale est plus longue et plus faible. En effet, si l'on regarde la pyramide carrée, on voit que chaque paire d'électrons équatoriales est repoussée par trois autres paires d'électrons, ceux avec lesquels elle fait un angle de 90°, tandis que la paire d'électrons axiaux (apicaux) est soumise à l'action non de trois, mais de quatre paires d'électrons qui font un angle de 90° avec eux.

Un travail tout à fait récent de Sommer et Rodewald [261] semble confirmer notre postulat. Pour expliquer la racémisation d'un fluorosilane optiquement actif ces auteurs admettent une pyramide carrée comme état intermédiaire et pensent même à un éventuel état hexacovalent sur le Si :



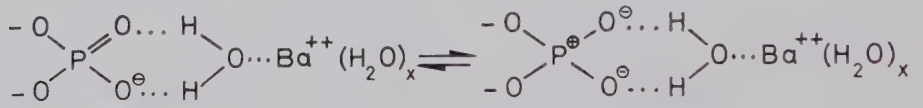
Les phosphates se trouvent en solution, d'habitude, sous forme tétracoordonnée. En présence de cations bivalents un complexe est formé qui a le caractère d'une association ionique entre ces cations et le phosphate, dans notre cas, des phosphodiesters cycliques, et qui implique les deux oxygènes non-liés, dont chacun a un degré de liaison π assez élevé, donc une densité électronique plus grande que celle des deux autres liaisons.

Le cation est fixé, par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, sur ces deux oxygènes et exerce un effet d'induction sur les liaisons P-O, et il induit une charge positive sur le phosphore :



On peut se demander pour quelle raison l'eau serait interposée entre le cation et l'anion. Premièrement, il faut considérer que le cation, le baryum dans notre cas, comme l'anion, le phosphate, sont hydratés et qu'il faut fournir une certaine énergie pour arracher cette eau aux ions, énergie dont la dépense doit être couverte par l'apport de l'énergie de formation du complexe; or, celle-ci n'est, en général, pas très élevée. Deuxièmement, un complexe direct entre le baryum et le phosphate nécessiterait un cycle à quatre membres, dans lequel les angles seraient d'environ 90°, puisque, pour que l'effet d'induction puisse s'exercer complètement, il faut que ce cycle soit plan. Les angles du tétraèdre sp^3 du phosphate sont d'environ 109°, et il nous semble peu probable qu'une telle compression puisse avoir lieu aussi bien pour l'angle O-P-O que pour les angles P-O-Ba. En milieu alcalin, où il est très probable qu'en présence de Ba la forme pentavalente $sp^3 d$ prédomine, une chélation directe serait cependant plus vraisemblable en ce qui concerne les angles de valence.

Nous proposons donc, au moins pour les pH pas trop élevés, un complexe formé entre le baryum et le phosphate avec une mélocule d'eau comme pont. Pour expliquer l'allure de nos courbes d'absorption en IR nous pensons être en présence d'un équilibre dynamique entre deux (ou plusieurs) formes, plus ou moins stables selon les conditions. Nous illustrons cet état de choses avec les deux formes *A* et *B* :



Forme A Forme B

En solution dans *l'eau normale* la forme *B* domine, et la bande d'absorption que nous observons autour de 1 210 cm^{-1} est la bande d'absorption des deux liaisons O-P qui sont, à peu de chose près, identiques : la bande est assez fine et son intensité qui augmente évidemment avec la polarisation de la liaison, est grande. La bande P-O-ionique, que nous trouvons autour de 1 150 cm^{-1}, est relativement plus faible pour la forme *B* que pour la forme *A*.

En solution dans l'*eau lourde*, c'est la forme *A* qui prodomine, l'effet inductif du cation s'exerçant moins bien à travers les deux deutérons qu'à travers les deux protons. La double liaison P-O apparaît davantage, il y a un déplacement considérable vers les fréquences plus élevées — ce qui était à prévoir puisque pour P=O la constante de force est plus grande — accompagné par une diminution de l'intensité de l'absorption. Comme la liaison P-O de la forme *B* intervient avec un coefficient d'absorption plus grand que celui de la forme *A*, dans ce cas, il y a élargissement de la bande, ce qui apparaît nettement.

Si nous comparons les spectres IR donnés par les sels de cyclohexylammonium, de sodium et de baryum des phosphates cycliques, il est évident que le rapport entre la forme *B* et la forme *A* se déplace dans le même ordre à la faveur de la forme *B*, que nous considérons d'ailleurs comme la forme réagissant ensuite avec l'espèce nucléophile attaquante, qui est l'hydroxyle, mais qui pourrait être, dans certains cas au moins, l'eau.

En ce qui concerne les cations Na et K, la formation de complexes n'a pu être établie par mesures conductimétriques : cependant des mesures de spectres IR semblent en indiquer la formation. Une action polarisante, bien que faible, pourrait donc s'établir entre ces ions monovalents et les phosphates cycliques.

Il est possible que l'élargissement très fort observé pour les bandes d'absorption infrarouge du sel de sodium par rapport au sel de baryum du butanediol-1,3-phosphate soit en relation avec une différence d'attache du sodium et du baryum sur le phosphate. Si c'était vrai, ce serait, indirectement, une preuve supplémentaire en faveur de nos arguments sur la complexation.

Il est intéressant de noter que la forme de complexe formé par le phosphate cyclique et le baryum que nous proposons est en accord avec l'allure des courbes conductimétriques à pH = 7. Ces courbes montrent que le complexe a une conductivité plus grande que ne l'ont les ions séparément.

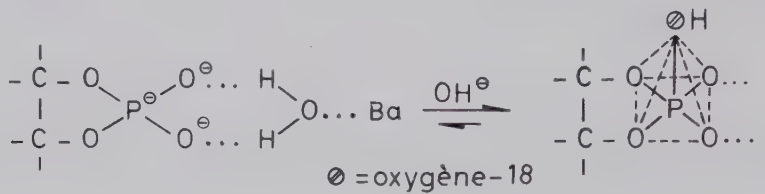
Pour qu'une hydrolyse des phosphates cycliques ait lieu, c'est-à-dire pour que le cycle s'ouvre, il est indispensable qu'à part les cations complexants, des ions hydroxyles soient également présents. Nous avons mis hors de doute qu'à la neutralité et à 100°, il n'y avait ni hydrolyse, ni incorporation d'oxygène-18 en présence du seul cation.

Les spectres IR des sels de sodium et de baryum du phosphate cyclique pris à pH 13,5 montrent clairement qu'un changement est intervenu par rapport aux spectres pris à pH 7. L'intensité des bandes d'absorption a diminué considérablement, la fréquence est restée la même. Nous croyons pouvoir expliquer ceci par le fait que les liaisons P-O libres (liées au cation) sont beaucoup moins polarisées qu'avant à cause de la compensation partielle de la charge positive sur le phosphore par l'hydroxyle. Ces spectres soutiennent donc la forme pentavalente du phosphore.

Un changement assez radical caractérise aussi les courbes conductimétriques des sels de baryum du même phosphate cyclique, prises à pH 13, par rapport à celles prises à pH 7. L'inflexion de la courbe se fait cette fois-ci vers les conductibilités plus grandes tout en étant beaucoup plus prononcée qu'à pH 7.

Nous proposons donc comme mécanisme de réaction pour l'hydrolyse des phosphates cycliques hexaatomiques une attaque nucléophile de l'ion hydroxyle sur le phosphore, préalablement rendu positif par formation d'un complexe avec le baryum ou, dans un moindre degré, avec le sodium. Comme nous n'avons pas observé d'incorporation d'isotope lors de nos expériences dans lesquelles nous avions réisolé et analysé le corps de départ non-hydrolysé, nous devons admettre que, dans l'état de transition, l'hydroxyle doit être attaché, d'une manière non équivalente à celle des quatre autres atomes d'oxygène, au phosphore. A cet état de transition, dans lequel l'atome de phosphore se trouve à l'état d'hybridation sp^3d, nous assignons la forme d'une pyramide

carrée. L'ion hydroxyle attaquant se trouve en position apicale, dont on sait qu'elle représente une liaison P-O plus faible qu'une même liaison en position équatoriale. L'hydrolyse a lieu lorsque l'énergie de la liaison P-O apicale devient plus grande que celle des liaisons équatoriales.



Nous pensons, pour des raisons que nous venons de donner, que la forme pentavalente du phosphore telle qu'elle apparaît dans la figure, est hautement vraisemblable, et toutes les données militent en sa faveur. Un mécanisme faisant appel à la bipyramide trigonale comme état de transition et à l'attaque d'un deuxième ion hydroxyle, bien que théoriquement possible, nous semble moins probable.

Les mécanismes de complexation que nous venons de proposer nous semblent également s'appliquer à l'hydrolyse du ARN et du ADN. Il est connu qu'en milieu alcalin le ARN est hydrolysé et donne des mononucléotides, que même le ADN est hydrolysé en milieu barytique [183] et qu'aussi bien le ARN que le ADN sont déphosphorylés en présence de Ce et surtout de La.

Pour expliquer l'hydrolyse alcaline du ARN, Todd et al. [89] ont proposé une cyclisation en supposant que l'état intermédiaire de l'hydrolyse était un triester cyclique formé par attaque de l'hydroxyle du C_2 sur le phosphore. Lipkin et al. [56] ont observé, lors de leurs essais d'hydrolyse effectués en présence d'eau enrichie en ^{18}O, l'incorporation d'un seul atome d'oxygène et font remarquer que, d'une part, il n'y a pas d'exemple connu d'estérification d'un anion de l'orthophosphate par un alcool et que, d'autre part, le mécanisme proposé par Todd et al. exige une incorporation de deux atomes de ^{18}O. Lipkin propose donc un autre mécanisme selon lequel l'attaque de l'ion alcoyl-oxyde et la fission hétérolytique de la liaison P-OR se font simultanément. Il nous faut remarquer que pour l'ADN une telle attaque par un ion alcoyl-oxyde n'est pas possible, parce qu'il n'y a pas de groupe hydroxyle libre en position ortho. Si l'hydrolyse se fait tout de même en présence d'ions baryum en milieu alcalin et en présence d'ions lanthane même en milieu faiblement alcalin, elle doit se faire, à notre avis, par un mécanisme semblable à celui que nous avons proposé pour nos diesters cycliques, c'est-à-dire par complexation initiale à l'aide de cations sur le groupe phosphate, et hydrolyse par attaque nucléophile d'un ion hydroxyle.

DEUXIÈME PARTIE

1 PARTIE EXPÉRIMENTALE

1,1 MÉTHODES GÉNÉRALES

1,11 Chromatographie sur papier.

Nous avons employé la technique de la chromatographie ascendante. Comme les chromatogrammes n'ont été faits ni à température ni à temps constants, nous donnons les R_f seulement à titre indicatif.

Nous nous sommes servi du papier Whatmann n° 1 et n° 3 MM. Ce dernier papier a toujours été lavé avant son emploi.

Les solvants utilisés étaient :

— solvant *A* : *n*-propanol : ammoniaque concentrée : eau (7 : 1 : 2),

— solvant *B* : isopropanol : ammoniaque concentrée : eau (7 : 1 : 2).

1,12 Réactifs spécifiques.

Pour révéler le *phosphate* nous nous sommes servis du réactif de Hanes et Isherwood [184].

Les *sucres réducteurs* sont mis en évidence par le phtalate acide d'aniline [262].

Les *groupements α-diol* ont été mis en évidence selon la méthode de Partridge [263] en faisant deux pulvérisations successives espacées d'environ 10 mn, la première avec une solution aqueuse de periodate de sodium à 1 %, la seconde avec une solution contenant 184 mg de benzidine dans 10 ml d'éthanol à 50 % additionné de 2 ml d'acétone et de 1 ml d'acide chlorhydrique 0,2 N.

1,13 Mise en évidence des fonctions acides des esters phosphoriques.

On mesure la variation de la concentration en ions H^+ en fonction de la quantité de soude ajoutée, avec un pHmètre Beckman du type G. Il s'agit donc d'un titrage potentiométrique. L'acide est libéré de son sel par une résine échangeuse d'ions, Amberlite IR, 120 (H^+), et titré ensuite avec de la soude N/10.

1,14 Préparation de la résine Amberlite IR-120.

On prépare la résine en sa forme acide par un lavage à l'acide chlorhydrique 2 N ou, mieux encore, à l'acide nitrique 1 N, suivi d'un lavage à l'eau jusqu'à neutralité

de l'effluent. Ensuite, on lave avec de la soude 2 N, avec de l'eau et, finalement, avec encore une fois de l'acide chlorhydrique (ou nitrique), suivi du lavage à l'eau.

Pour mettre la résine sous forme de cyclohexylammonium, on fait passer lentement une solution diluée de cyclohexylamine fraîchement distillée à travers la colonne, en prenant bien soin d'éviter toute absorption de gaz carbonique. On lave ensuite à l'eau jusqu'à neutralité de l'effluent.

1,15 **Filtration sur gel Sephadex.**

Nous avons utilisé la filtration sur gel en employant le « Sephadex G-25 » (medium = 100-250 mesh sur les standards US) dans une colonne de 50 × 3 cm. La grandeur de la colonne peut varier dans des limites assez larges, le rapport heuteur/diamètre n'étant pas critique. Nous avons cependant tenu à rester dans les limites préférentielles indiquées par le fabricant (10:1-20:1). Un procédé pour remplir la colonne est décrit par Flodin [264].

1,16 **Spectres infrarouges.**

1° Spectres des solides :

Ces spectres ont été pris au laboratoire de spectroscopie de la Fondation Curie.

Nous avons employé la technique de pastillage en KBr aussi bien pour les phosphates inorganiques que pour les phosphates organiques. 1 à 2 mg de la substance finement pulvérisée ont été mélangés avec 600 mg de KBr (pour analyses) préalablement séchés dans une étuve à 110°. Le pastillage a été effectué dans une presse à pastiller sous vide et à haute pression.

L'enregistrement des spectres a été fait avec un spectrographe Perkin-Elmer, modèle 21, à optique de NaCl.

2° Spectres des solutions aqueuses.

Ces spectres ont été pris sur le spectromètre Perkin-Elmer, modèle 221, avec réseau et optique NaCl, dans le laboratoire de physique de M. le Professeur J. P. Mathieu. La plupart des spectres ont été faits entre des lamelles de fluorine (CaF_2) à une épaisseur fixe de 45 μ. Pour un certain nombre de mesures nous avons utilisé une cuve spéciale à paroi de fluorine et à épaisseur variable. Le faisceau de référence contenait, selon les mesures, de l'eau normale ou lourde.

Pour les mesures nous avons utilisé des sels des phosphates que nous avions préparés intentionnellement pour être en présence du seul cation dont nous voulions examiner le comportement. Dans quelques rares cas nous avons ajouté un cation supplémentaire au cation déjà présent.

Certains sels de phosphates organiques, spécialement les sels de baryum, contiennent de l'eau de cristallisation assez difficile à enlever. Pour éliminer ce contaminant dans le cas des mesures effectuées en D_2O le sel préalablement séché sous vide en présence de P_2O_5 a été dissous dans une petite quantité de D_2O, puis la solution lyophilisée. Ce processus a été répété deux fois avant les mesures spectrométriques.

1,17 **Mesures conductimétriques.**

Les mesures de conductimétrie ont été effectuées dans le laboratoire du professeur M. Quintin, à la Sorbonne.

Nous avons fait nos mesures avec un pont LKB du type 3216 B à circuit d'équilibre à terre de Wagner et avec un oscillateur RC à audio-fréquence donnant 1 000 et 2 000 Hz à 2 V maximum [265]. La gamme de mesure est de 1.11 000 $\Omega = 9.10^{-5}$ - 1 Ω. Pour les décades nous avons employé une boîte à résistances extérieures A.O.I.P. Toutes les connections ont été faites en fils blindés. Avec les capacités contenues dans le pont, les capacités en parallèle dans l'échantillon peuvent être équilibrées jusqu'à 10 500 pF. Autour du point d'équilibre la tension maximale appliquée à l'échantillon est de 1 V.

La température ayant une très grosse influence sur les conductibilités nous avons contrôlé celle-ci à 0,05° près par un thermostat pour obtenir une précision de 0,1 %.

Pour le titrage proprement dit nous avons employé une burette de précision, ajoutant, grâce à celle-ci, le réactif directement dans la cellule conductimétrique, dont le contenu a été soigneusement mélangé après chaque addition. Les mesures ont été faites 15 mn après l'addition du réactif pour que l'équilibre de la température soit réalisé. Pour toutes les mesures la correction de volume a été effectuée. Nous n'avons cependant pas fait la correction de pH, celui-ci ne variant pas lors de nos mesures, excepté la variation initiale très forte lors des mesures à pH très alcalin, pendant laquelle nous n'avons pas tenu compte des conductibilités mesurées.

La cellule comportait des électrodes de platine platinées d'une surface de plus d'un cm^2 chacune. Les phénomènes de polarisation étaient donc négligeables.

1,18 **Dosages isotopiques.**

Les dosages isotopiques ont été exécutés en partie aux laboratoires du C.E.A. et en partie au « Weizmann Institute » à Rehovoth (Israël), dans le laboratoire du professeur D. Samuel.

Les phosphates ont été analysés selon la méthode de Anbar et Guttmann [131]. et l'eau selon celle de Anbar [132].

1,19 **Détermination des sucres en solution.**

Nous avons mis en évidence les glucosides dans les effluents de la colonne en employant la méthode colorimétrique de Dubois et al. [126]. On ajoute 1 à 2 ml de solution contenant 10 à 70 μg de sucre et 1 ml d'une solution de phénol à 5 % dans l'eau. Ensuite on ajoute 5 ml d'acide sulfurique à 95 % (p. A.) et on laisse reposer pendant 10 mn à température ambiante avant de plonger le tube pendant 10 à 20 mn dans un bain-marie à 30°. La couleur reste stable pendant plusieurs heures et l'on peut faire la mesure à 4 900 Å pour les hexoses ou à 4 800 Å pour les pentoses ou acides uroniques.

1,110 **Détermination de phosphate inorganique en solution.**

Nous nous sommes servis de la méthode de Machebœuf et Delsal [161]. Cette réaction est sensible aux phosphates et aux silicates.

Pour transformer le phosphate organique en phosphate inorganique, on le soumet à une minéralisation. Une quantité de substance contenant environ 50 à 100 µg de *phosphore* et pas plus de 25 mg de substance organique dans 1 ml d'eau est placée dans un petit matras Kjeldahl ou dans un tube en Pyrex assez grand. On ajoute 0,3 ml d'acide sulfurique concentré et on chauffe sur un bec Bunsen dont la flamme, dans des conditions optimales, doit avoir à peu près une longueur de 1,5 cm. Le tube est tenu incliné à 1 cm au-dessus de la flamme, et l'on agite légèrement durant toute l'opération, pendant laquelle il se dégage des vapeurs d'eau. Il ne faut pas laisser se dégager des fumées blanches. Après avoir laissé refroidir on ajoute une à deux gouttes d'eau oxygénée à 30 % (= 100 volumes O) et on chauffe légèrement pour décolorer la solution. Si besoin est, on ajoute encore une ou deux fois une à deux gouttes d'eau oxygénée, après avoir laissé refroidir, et on chauffe encore.

Après refroidissement de la solution minéralisée, on transvase le tout dans une fiole jaugée de 10 ml, opération pendant laquelle on peut utiliser jusqu'à environ 5 ml d'eau pour rincer les parois du récipient. On prépare en même temps un « blanc », en ajoutant 0,3 ml d'acide sulfurique concentré à quelques millilitres d'eau dans une fiole de 10 ml, que l'on traitera par la suite de la même manière que les autres fioles.

Aux fioles ainsi préparées on ajoute 2 ml d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 % dans l'eau, ensuite 1 ml d'une solution aqueuse de sulfite de sodium à 20 %, pour terminer avec 1 ml d'une solution aqueuse à 0,5 % d'hydroquinone (laquelle avait été acidulée lors de sa préparation par une ou deux gouttes d'acide sulfurique concentré pour mieux la conserver). On ramène le volume à 10 ml avec de l'eau. Après avoir agité on laisse reposer pendant 30 mn. On fait la lecture à 6 000 Å et l'on compare la valeur lue à la courbe d'étalonnage établie au préalable avec une solution de concentration connue de KH_2PO_4.

La couleur est assez stable pendant plus d'une heure, tout au moins si l'on s'en tient rigoureusement à la prescription donnée. La température ambiante semble influencer un peu le développement de la couleur. L'erreur pour le P_i est inférieure à 1% pour une quantité d'acide sulfurique concentré comprise entre 0,2 et 0,4 ml. Lors du chauffage il faut éviter de monter à beaucoup plus de 150°. Dans ces conditions il n'y a pas de dissolution appréciable de silice, ce qui constituerait une source d'erreur grave, 1 mg de silice donnant en 30 mn la même couleur que 400 µg de phosphore.

1,111 **Détermination de protéines.**

La protéine dans les effluents de la colonne de Sephadex a été mise en évidence soit par la réaction à la ninhydrine (2 % dans l'éthanol), soit par l'absorption à 2 800 Å.

Dessalage du phosphate contenant de la protéine.

Pour séparer le phosphate inorganique formé lors de l'hydrolyse enzymatique des monophosphates des protéines de l'enzyme provoquant cette hydrolyse, nous avons employé un dessaleur (« desalter ») (Maison Baird et Tatlock, London Ltd, Cheadwel Heath /Essex) à l'envers.

L'appareil consiste en trois compartiments séparés les uns des autres par des membranes échangeuses d'ions : une membrane échangeuse de cations entre la cathode

et le compartiment du milieu et une membrane échangeuse d'anions entre l'anode et le milieu. On applique une tension aux deux électrodes de platine qui fait migrer les ions se trouvant dans le compartiment central à travers les membranes échangeuses; celles-ci empêchent cependant les grandes molécules de protéine de passer. L'intensité du courant ainsi créé est réglable jusqu'à environ 80 mA. Le compartiment anodique est rempli de potasse 0,2 N et le compartiment cathodique d'acide sulfurique 0,2 N.

Entre les différents essais la membrane est remise sous forme chlorure en faisant migrer du NaCl en solution placé dans le compartiment central.

Le transport des ions à travers les membranes se fait presque quantitativement si l'on prolonge assez longtemps le passage du courant.

1,112 **Mesures de résonance magnétique nucléaire (RMN).**

Les mesures en RMN du proton ont été exécutées avec un appareil Varian A 60 dans le laboratoire de spectroscopie hertzienne du Professeur R. Freymann. Nous avons utilisé des solutions dans l'eau et dans D_2O. Pour préparer ces dernières nous avons procédé comme décrit plus haut (§ 1,16, 2°).

Avant chaque série de mesures nous avons étalonné l'appareil sur la résonance du TMS (tétraméthylsilane), qui nous servait pour toutes les mesures comme standard intérieur. Nous avons travaillé avec un temps de balayage de 250 s ; la largeur de balayage variait selon les circonstances.

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage spin-spin sont indiqués séparément sur chaque spectre.

1,113 **Diagrammes aux rayons X.**

Deux diagrammes ont été pris par M. Barraud, Maître de Conférences, dans le Service de Physiologie cellulaire à la Sorbonne.

1,114 **Spectres U. V.**

Les spectres U.V. ont été pris avec un spectromètre Zeiss.

1,2 HYDROLYSE ALCALINE DES PHOSPHATES CYCLIQUES

1,21 **Hydrolyse de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate.**

246,8 mg d'α-méthylglucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) ont été dissous dans 2 ml d'eau enrichie en oxygène-18 (4,00 % atome-excès), ce qui donne une solution 0,35 M.

100,5 mg de baryum métallique coupés sous éther sont dissous dans la solution de phosphate de sucre. Pendant cette opération la solution est protégée par un tube à chaux sodée.

Le ballon contenant la solution, muni d'un réfrigérant et d'un tube à chaux sodée, a été chauffé sur un bain-marie bouillant pendant 4 h.

On refoidit la solution et on la filtre pour éliminer un léger précipité; on ramène ensuite le pH du filtrat à 8, puis précipite le monophosphate présent par quatre volumes d'éthanol anhydre.

Le précipité de monophosphates de l'α-méthylglucoside est lavé et séché à 80° (0,01 mm Hg) sur P_2O_5 pendant une nuit.

143 mg du mélange de monophosphates ont été dissous dans 5 ml d'eau et 5,5 ml de tampon ammoniaque : chlorure d'ammonium 0,02 M, pH 9,2. A cette solution nous avons ajouté quatre gouttes de $MgCl_2$ (0,1 N) et 9,5 mg de phosphatase alcaline (Sigma, purifiée). Le mélange est ensuite incubé pendant 24 h à 37°. Après cette période nous avons remis en solution le phosphate inorganique précipité par addition de la résine échangeuse d'ions IR-120 (H^+). Le pH de la solution ne doit pas tomber au-dessous de 4. On filtre et ramène le pH du filtrat à 7 par addition de potasse.

Pour séparer le phosphate non précipité et le glucoside de la protéine enzymatique, nous nous sommes servi de la chromatographie sur gel de dextran « Sephadex ». La colonne a été préparée selon la méthode indiquée dans la partie générale et l'élution a été faite avec l'eau.

Lors du premier passage à travers la colonne presque toute la partie absorbante, à 2 800 Å, se trouvait dans les premiers tubes. Le sucre et le phosphate apparaissent ensuite, contaminés vers la fin de l'élution par une substance absorbant à 2 800 Å non identifiée. Pour enlever ce contaminant, nous avons concentré sous vide toutes les fractions contenant du sucre et du phosphate et nous avons fait passer la solution une deuxième fois à travers la colonne de Sephadex : toute impureté protidique était alors éliminée.

Nous avons ensuite concentré la solution et précipité le phosphate inorganique par de la baryte saturée et addition de quelques gouttes de potasse concentrée pour amener le pH à 12. On filtre, ramène le pH du filtrat à 7 par addition de petites quantités de résine IR-120 (H^+), élimine la résine par filtration puis on évapore le filtrat à sec. Le résidu ainsi obtenu est extrait par du MeOH, la solution est concentrée et le méthylglucoside cristallisé par addition d'éther éthylique anhydre. Après un repos de 12 h à + 4° on essore les cristaux et on les sèche sous vide sur P_2O_5.

Le précipité de phosphate de baryum a été lavé avec de l'eau trois fois, puis mis en suspension dans une petite quantité d'eau. On ajoute à cette suspension de petites quantités de résine IR-120 (H^+) pour éliminer les ions Ba^{++}; on filtre, on ramène le pH de la solution claire par addition de potasse diluée à 4,4, on concentre la solution sous vide jusqu'à environ 0,5 ml et on précipite le KH_2PO_4 par addition de quatre volumes d'éthanol. Le précipité est ensuite séché sous vide (0,01 mm Hg) à 110°.

Le méthyl-α-D-glucoside et le phosphate de potassium (KH_2PO_4) ont été identifiés par leurs spectres IR, qui correspondaient parfaitement avec des standards dissous et précipités de la même façon. Ceci, comme nous l'avons déjà indiqué dans la première partie de ce travail, nous semblait nécessaire, puisqu'il semble que le spectre, surtout celui du phosphate, puisse varier considérablement selon les conditions dans lesquelles il a été précipité.

Le dosage isotopique, exécuté sur les échantillons de sucre et de phosphate, a donné les résultats suivants (n° 15) :

KH_2PO_4	0,980 % atome-excès
Méthyl-α-D-glucoside	0,000 % atome-excès
Eau utilisée	4,00 % atome-excès

1,22 **Hydrolyse barytique de l'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate en solution moins concentrée.**

100 mg d'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate ont été dissous dans 3 ml d'eau enrichie en ^{18}O et hydrolysés pendant 4 h sur un bain-marie bouillant après addition de 117 mg de baryum métallique. La solution était donc de 0,095 M en phosphate de sucre.

Pour l'hydrolyse enzymatique ont été dissous 78,1 mg du mélange de monophosphates dans 3 ml d'eau et 4 ml de tampon chlorure d'ammonium : ammoniaque (0,02 M, pH 9,2). Trois gouttes d'une solution de chlorure de magnésium ont été ajoutées ainsi que 5,5 mg de phosphatase alcaline Sigma. Le tout a été incubé pendant 18 h à 37-38°.

Le phosphate libéré a été isolé par dissolutions et précipitations successives avec l'IR-120 (H^+) et la baryte respectivement, jusqu'à ce que le précipité ne contienne plus de protéine. Le KH_2PO_4 a été précipité à partir d'une solution à pH 4,4 par addition d'éthanol anhydre. Après séchage à 110° sous vide (0,01 ml Hg) et vérification de son spectre IR, le KH_2PO_4 a donné les résultats suivants d'incorporation isotopique (n° 20) :

KH_2PO_4	0,980 % atome-excès
Eau utilisée	4,000 % atome-excès

1,23 **Hydrolyse du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate par la baryte.**

230 mg de β-phényl-glucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium), correspondant à environ 0,5 mole, ont été dissous dans 2,3 ml d'eau enrichie en ^{18}O (4,00 % atome-excès). A cette solution on a ajouté 105 mg de baryum métallique. Le ballon de 5 ml dans lequel se trouvait la solution a été muni d'un réfrigérant et d'un tube à chaux sodée et chauffé pendant 3 h sur un bain-marie bouillant.

On dilue la solution refroidie en ajoutant de l'eau pour redissoudre les monophosphates et on filtre pour enlever le phosphate inorganique éventuellement formé. On ramène le pH de la solution à 8 par addition de la résine IR-120 (H^+), on filtre, on concentre sous vide et on précipite les monophosphates par addition d'environ quatre volumes d'éthanol anhydre. On laisse reposer le précipité à peu près deux heures dans la chambre froide.

Le précipité des monophosphates est essoré, lavé à l'éthanol anhydre et séché sur P_2O_5 à 80° sous vide (0,01 mm Hg). Le rendement est de 85 %.

Pour l'hydrolyse enzymatique du mélange de monophosphates nous avons dissous 153 mg de ce mélange dans 17 ml d'eau. A cette solution nous avons ajouté 6 ml de tampon chlorure d'ammonium : ammoniaque 0,02 M (pH 9,2), cinq gouttes d'une solution de chlorure de magnésium 0,1 N et 15 mg de phosphatase alcaline intestinale (Sigma, purifiée). Le tout a été incubé pendant 18 h dans une étuve à 37°.

Après l'hydrolyse enzymatique, le précipité, contenant le phosphate inorganique (sous forme de phosphate de baryum et de magnésium-ammonium) insoluble ainsi que des protéines coprécipitées, a été centrifugé et lavé à l'eau.

Le surnageant a été traité comme il a été décrit pour l'α-méthylglucoside dans la partie précédente : après avoir ramené son pH à neutralité par addition de IR-120 (H^+) nous l'avons fait passer deux fois à travers une colonne de Sephadex, pour enlever

les protéines. Le phényl-β-D-glucoside a été isolé en précipitant les ions baryum et chlorure restés en solution par addition de sulfate d'argent; la solution est ensuite concentrée à sec sous vide, le résidu repris avec de l'éthanol anhydre et le sucre cristallisé par addition lente d'éther éthylique anhydre. Le précipité a été essoré et lavé puis séché sous vide sur P_2O_5 à 80°.

Le précipité contenant le phosphate inorganique et des impuretés protéiques a été traité comme décrit pour les deux hydrolyses précédentes de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate. L'analyse isotopique a donné les résultats suivants (n° 18) :

KH_2PO_4	0,980 % atome-excès
Phényl-β-D-glucoside	0,000 % atome-excès
Eau utilisée	4,00 % atome-excès

1,24 **Hydrolyse du Butanediol-1,3-phosphate (sel de baryum) par la baryte.**

Une solution de 263 mg de butanediol-1,3-phosphate dans 2,5 ml d'eau enrichie en ^{18}O, à laquelle nous avons ajouté 116 mg de baryum métallique coupé sous éther, a été maintenu pendant 20 h 45 sur un bain-marie bouillant. La solution a été amenée à pH = 8 avec l'IR-120 (H^+) centrifugée et lyophilisée. Le résidu a été ensuite séché à 70° sous vide (0,01 mm Hg).

277 mg des monophosphates ainsi obtenus ont été transformés en sel d'ammonium par passage à travers une colonne d'échangeur de cations IR-120 $(NH_4)^+$. La solution a été concentrée à 15 ml et additionnée de 10 ml de tampon de chlorure d'ammonium : ammoniaque 0,02 M (pH = 9,2), de quatre gouttes d'une solution de chlorure de magnésium 0,1 N et de 20 mg de phosphatase alcaline (Sigma, purifiée).

Le mélange a été incubé pendant 72 h à 37°. Comme après ce temps l'hydrolyse n'était pas encore complète, nous avons encore ajouté 13 mg d'enzyme et continué l'incubation à 37° pendant encore 16 h. Après ce temps, les monophosphates ont été entièrement hydrolysés.

La solution ainsi obtenue a été divisée en deux parties égales, *a* et *b*. La solution *a* a été traitée par la résine IR-120 (H^+) pour ajuster son pH à 7; cette solution a été mise dans un appareil dessaleur (« desalter »), préalablement décrit, et soumise à l'action d'un courant d'une intensité initiale de 80 mA, décroissant à 3 mA. Le pH de la solution se trouvant dans le compartiment anodique (et contenant le phosphate ayant traversé la membrane échangeuse d'ions) a été amené à 7 par addition de résine IR-120 (H^+). Ensuite, la solution est concentrée sous vide et son pH ajusté à 4,4 à l'aide de la même résine. Le phosphate inorganique est précipité sous forme de KH_2PO_4 par addition d'éthanol anhydre, essoré et séché à 110° (0,01 mm Hg) pendant une nuit. Le dosage isotopique du KH_2PO_4, vérifié auparavant par spectrométrie IR, a donné la valeur suivante (n° 24 *a*) :

KH_2PO_4	0,662 % atome-excès
Eau utilisée	4,00 % atome-excès

La solution *b* a été acidifiée par la résine IR-120 (H^+) et le phosphate inorganique précipité par addition de baryte. Pour éliminer toute trace de protéine la préci-

pitation a été répétée cinq fois puis le phosphate isolé sous forme KH_2PO_4; l'analyse isotopique a donné les résultats suivants (n° 24 *b*) :

KH_2PO_4	0,873 % atome-excès
Eau utilisée	4,00 % atome-excès

1,3 ÉCHANGE ISOTOPIQUE SUR MEMBRANE

La dernière hydrolyse prouve (1,24) l'échange isotopique sur membrane.

1,31 Vérification de l'échange isotopique intervenant sur membrane.

24 mg de KH_2PO_4 contenant 0,777 % atome-excès de ^{18}O ont été dissous dans 5 ml d'eau. Cette solution a été placée dans le dessaleur et le phosphate a traversé la membrane échangeuse d'anions par suite de la tension appliquée. L'intensité initiale du courant était de 90 mA et diminuait progressivement jusqu'à environ 3 mA. Temps de l'opération : 2 h 30. Résultat de l'analyse isotopique (n° 11) :

KH_2PO_4 récupéré	0,577 % atome-excès
KH_2PO_4 initial	0,777 % atome-excès

1,32 Hydrolyse du butanediol-1,3-phosphate par la baryte.

255,2 mg de butanediol-1,3-phosphate (sel de baryum) ont été dissous dans 2,5 ml d'eau enrichie en ^{18}O. A cette solution ont été ajoutés 139 mg de baryum métallique. Le mélange a été maintenu sur un bain-marie bouillant pendant 20 h.

On élimine un petit précipité par centrifugation et on ajuste le pH à 8 à l'aide de résine IR-120 (H^+). On précipite les monosphosphates du butanediol par addition de plusieurs volumes d'acétone à leur solution concentrée. Le précipité est séché à 75° (0,01 mm Hg).

128 mg de monophosphates de butanediol ont été hydrolysés par 11,5 mg de phosphatase alcaline purifiée Sigma en solution dans 2 ml d'eau et 8 ml de tampon ammoniaque : chlorure d'ammonium (0,02 M, pH 9,2) à laquelle on a ajouté quatre gouttes d'une solution de chlorure de magnésium 0,1 N.

Le phosphate inorganique a été isolé par passage à travers la membrane du dessaleur décrit auparavant et le KH_2PO_4, après avoir été vérifié par spectrométrie IR, soumis à l'analyse par spectrométrie de masse, laquelle a donné le résultat suivant (n° 23) :

KH_2PO_4	0,620 % atome-excès
Eau utilisée	4,00 % atome-excès

1,33 Hydrolyse de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate par la baryte.

Cette hydrolyse a été exécutée d'une manière analogue.

Les quantités employées étaient de 234 mg d'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) dissous dans 2 ml d'eau enrichie en ^{18}O et de 110 mg de baryum métallique. Le temps d'hydrolyse était de 4 h.

Pour l'hydrolyse enzymatique ont été employés 127 mg du mélange de monophosphates dissous dans 5 ml d'eau, 5 ml du tampon chlorure d'ammonium : ammoniaque (0,02 M, pH 9,2), cinq gouttes de chlorure de magnésium et 9 mg de phosphatase alcaline purifiée Sigma. L'incubation s'est faite à 37° pendant une nuit.

Le phosphate a été isolé par passage à travers la membrane dans le dessaleur selon la méthode employée dans les expériences précédentes (n° 21) :

KH_2PO_4 ..... 0,268 % atome-excès
Eau utilisée ..... 4,00 % atome-excès

1,34 **Hydrolyse du β-phényl-glucoside-4,6-phosphate par la baryte.**

229 mg de β-phényl-D-glucosine-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) ont été hydrolysés pendant 3 h à 100° dans une solution de 105,4 mg de baryum metallique dans 3 ml d'eau enrichie en ^{18}O.

120 mg du mélange de monophosphates ont été incubés pendant 14 h à 37° dans une solution contenant 15 mg de phosphatase alcaline (Sigma, purifiée).

Le phosphate inorganique a été isolé par précipitation avec l'éthanol anhydre après passage à travers la membrane échangeuse d'anions. L'analyse isotopique a donné le résultat suivant (n° 22) :

KH_2PO_4 ..... 0,777 % atome-excès
Eau utilisée ..... 4,00 % atome-excès

1,4 HYDROLYSES DES PHOSPHATES CYCLIQUES PAR NaOH

Les hydrolyses suivantes ont été effectuées selon la méthode décrite dans le paragraphe 1,2 de la partie expérimentale. La concentration en isotope ^{18}O de l'eau employée pour ces hydrolyses était de 1,88 % atome-excès.

SUBSTRAT hydrolysé	BASE	TEMPS d'hydrolyse	PRODUIT isolé		ANALYSES (% atome-excès)		NUMÉRO d'analyse
α-méthylglucoside-4,6-phosphate	NaOH	65 h	monophosphate		0,10		29 A
α-méthylglucoside-4,6-phosphate	NaOH	65 h	monophosphate		0,11		33
β-phénylglucoside-4,6-phosphate	NaOH	48 h	mono-phosphate	KH_2 PO_4	0,12	0,16	38
Butanediole-1,3-phosphate.....	NaOH	70 h	mono-phosphate	KH_2 PO_4	0,18	0,17	34

1,5 CONTROLE DE LA RÉACTION D'INCORPORATION

1,51 Hydrolyse de l'α-méthyl-glucoside-4,6-phosphate par la baryte et isolement du phosphate cyclique non hydrolysé.

Nous avons dissous 135 mg d'α-méthylglucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) et 55 mg de baryum métallique dans 1,3 ml d'eau marquée par l'oxygène-18.

Cette solution a été chauffée pendant 20 mn sur un bain-marie bouillant, puis refroidie immédiatement dans de la glace. Les ions baryum ont été enlevés par la résine IR-120 (H^+), puis la solution, concentrée sous vide à la température du laboratoire. Cette solution fut appliquée sur des bandes de papier Whatman 3 MM d'une largeur de 7 cm, en laissant de chaque côté 1,5 cm de bande de papier libre. On laisse les chromatogrammmes se développer pendant la nuit, puis on coupe les deux bandes latérales et on détecte sur elles la position des phosphates. Les R_f des monophosphates et du phosphate cyclique étant très différents, ils sont parfaitement séparés.

La partie de la bande principale contenant le phosphate cyclique a été éluée avec de l'eau pendant la nuit en cousant sur cette bande un petit morceau de papier Whatman lavé auparavant et en laissant l'eau descendre lentement à travers le papier et s'égoutter par une petite languette.

L'éluat contenant le phosphate cyclique récupéré est concentré sous vide. On y ajoute 110 mg de bromure de baryum, concentre à sec, reprend le résidu dans de l'éthanol et précipite le sel de baryum du phosphate cyclique par addition d'éther éthylique anhydre.

Le spectre IR du produit récupéré a été pris et correspond parfaitement à celui du sel de baryum du produit de départ.

L'analyse par spectrométrie de masse du produit réisolé montre qu'il n'y a pas eu enrichessement en ^{18}O (n° 03) :

α-méthylglucoside-4,6-phosphate	0,005 % atome-excès
Eau utilisée	4,00 % atome-excès

1,52 Hydrolyse du butanediol-1,3-phosphate par la baryte et isolement du phosphate cyclique non-hydrolysé.

155 mg du butanediol-1,3-phosphate (sel de baryum) et 68 mg de baryum métallique dissous dans 1,5 ml d'eau enrichie en ^{18}O ont été chauffés pendant 30 mn sur un bain-marie bouillant.

Le phosphate cyclique de départ a été isolé de la même façon que le phosphate cyclique de l'expérience précédente, par séparation sur bande de papier Whatman 3 MM, et précipité sous forme de sel de baryum par addition d'acétone à sa solution concentrée.

Après séchage du produit isolé à 50° (0,01 mm Hg) sur P_2O_5, le spectre IR était satisfaisant. Le dosage isotopique n'a pas montré d'enrichissement en ^{18}O (n° 04) :

Butanediol-1,3-phosphate réisolé	0,004 % atome-excès
Eau utilisée	1,88 % atome-excès

1,53 **Essai d'hydrolyse d'α-méthylglucoside-4, 6-phosphate à pH 7 en présence d'ions baryum.**

69 mg d'α-méthylglucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) ont été dissous dans 1,3 ml d'eau enrichie en oxygène-18. A cette solution nous avons ajouté 55 mg de chlorure de baryum, après quoi elle a été chauffée pendant 4 h à 100°. Nous n'avons pas trouvé trace d'hydrolyse par chromatographie après ce temps.

Le phosphate cyclique a été réisolé par précipitation avec de l'éthanol anhydre et a donné un spectre IR satisfaisant. L'analyse isotopique a donné le résultat suivant (n° 26) :

α-méthylglucoside-4,6-phosphate	0,005 % atome-excès
Eau utilisée	1,88 % atome-excès

1,54 **Essai d'échange isotopique sur l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate à pH 7.**

Une solution de 48 mg du sel de cyclohexylammonium de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate dans 1 ml d'eau enrichie en ^{18}O a été chauffée pendant 4 h sur un bain-marie bouillant. Le phosphate cyclique a été réisolé sous forme de sel de baryum par précipitation avec de l'éthanol, et trouvé identique au standard par spectrométrie IR. Résultat de l'analyse isotopique (n° 28).

α-méthylglucoside-4,6-phosphate	0,009 % atome-excès
Eau utilisée	1,88 % atome-excès

1,55 **Essai d'échange isotopique par l'α-méthylglucoside-6-phosphate à pH alcalin.**

102,6 mg d'α-méthylglucoside-6-phosphate et 49,1 mg de baryum métallique ont été dissous dans 1 ml d'eau marquée en ^{18}O et hydrolysés pendant 16 h à 95°.

Le précipité contenant du phosphate de baryum a été centrifugé et le surnageant, contenant le monophosphate non-hydrolysé, ramené à pH 8 avec de l'IR-120 (H^+). Le monophosphate a ensuite été précipité par l'éthanol anhydre, essoré et séché sous vide sur P_2O_5. L'analyse isotopique a donné le résultat suivant (n° 32) :

α-méthylglucoside-6-phosphate	0,001 % atome-excès
Eau utilisée	1,88 % atome-excès

1,6 DÉTERMINATION DE LA VITESSE D'HYDROLYSE DE L'α-MÉTHYLGLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE PAR DOSAGE DU PHOSPHATE CYCLIQUE NON HYDROLYSÉ

Une quantité déterminée de phosphate cyclique (dans notre cas, toujours 240 mg d'α-méthylglucoside-4,6-phosphate, sel de cyclohexylammonium) est hydrolysée à 80°, dans un thermostat, en employant des quantités équivalentes des différentes bases, pour lesquelles l'effet cationique est à déterminer; la concentration des bases était toujours 0,37 *N*.

A des intervalles définis on prélève 0,5 ml du mélange d'hydrolyse que l'on place dans un petit tube contenant une résine échangeuse d'ions IR-120 $(NH_4)^+$ pour

enlever les cations qui pourraient gêner lors de la chromatographie sur papier. Ensuite on place des quantités toujours égales et bien connues sur deux bandes de papier Whatman 3 MM soigneusement lavé auparavant. Une des bandes servira de référence. L'application de la solution se fait avec une micro-seringue comportant une aiguille en verre courbée en angle droit (AGLA). Après chaque application le papier a été séché, de manière à limiter le plus possible la surface de la tache.

Après avoir développé le chromatogramme, les deux bandes sont séparées : une des bandes sert de référence pour détecter la position du phosphate sur l'autre, de laquelle on l'élue avec de l'eau. Les éluats contenant le phosphate cyclique récupéré ont été concentrés par lyophilisation et le phosphate a été déterminé par la méthode de Machebœuf et Delsal [161], décrite dans la partie générale.

1,61 **Hydrolyse par la baryte.**

TEMPS d'hydrolyse (heures)	NUMÉRO TUBE	DENSITÉ OPTIQUE mesurée pour le phosphate cyclique récupéré
1/2	2	2,11
1	3	1,60
2	4	1,11
3	5	0,75
4	6	0,54

1,62 **Hydrolyse par la potasse.**

TEMPS d'hydrolyse (heures)	NUMÉRO TUBE	DENSITÉ OPTIQUE mesurée pour le phosphate cyclique récupéré
1	1	2,80
2	2	2,68
3	3	2,60
4	4	2,52

1,63 **Hydrolyse par la lithine.**

TEMPS d'hydrolyse (heures)	NUMÉRO TUBE	DENSITÉ OPTIQUE mesurée pour le phosphate cyclique récupéré
0	1	3,00
1	2	2,69
2	3	2,42
3	4	2,26
4	5	2,20

1,64 **Hydrolyse par la potasse en présence d'ions baryum.**

TEMPS d'hydrolyse (heure)	NUMÉRO TUBE	DENSITÉ OPTIQUE mesurée pour le phosphate cyclique récupéré
0	1	3,00
1	2	2,08 et 2,28
2	3	1,79
3	4	1,48
4	5	1,32

Nous avons exécuté la plupart des mesures en double. L'erreur moyenne se situe autour de 5 %, à l'exception d'un cas signalé plus haut (§ 2,2).

1,7 SYNTHÈSE DU BUTANEDIOL-1,3-PHOSPHATE

1° Préparation du butanediol-1,3-(phényl-phosphate).

Avant de commencer l'expérience on laisse toute la verrerie dont on aura besoin lors de la phosphorylation pendant 1 à 2 h dans une étuve à 120° pour enlever des traces d'eau et l'on bouche les cols par des tubes remplis de gel de silice avant de les laisser refroidir.

Dans un ballon de un litre à trois cols on dissout 15 g de butanediol-1,3 redistillé (P. E. 204°) dans 350 ml de pyridine anhydre. Un des cols du ballon est muni d'un thermomètre descendant jusqu'à —30°, le deuxième, d'un tube de gel de silice et le troisième, d'une ampoule à brôme d'un volume de 150-200 ml. Pour l'agitation on se sert d'un agitateur magnétique.

Le ballon est placé dans un bain de glace-NaCl à la température, d'au moins —15°, qui doit être maintenue lors de la phosphorylation.

Lorsque la solution pyridinique de butanediol a atteint la température du bain, on ajoute lentement 36 g de dichlorophénylphosphate dissous dans 120 ml de pyridine anhydre, par l'ampoule à brôme, tout en maintenant une agitation uniforme dans le ballon.

Après l'addition du réactif on abandonne le mélange afin qu'il atteigne la température ambiante et on le laisse reposer pendant 12 à 24 h.

On ajoute ensuite environ 10 ml d'eau puis on chasse la pyridine sous vide en ayant soin de ne pas laisser monter la température du bain au-dessus de 30°.

On reprend le résidu avec de l'eau et du chloroforme, on sépare les couches et on lave la solution chloroformique plusieurs fois avec de l'eau pour enlever le plus de pyridine possible.

On sèche la couche chloroformique sur du chlorure de calcium et on chasse le solvant sous vide. Le résidu cristallise en général tout de suite; on le recristallise dans le diisopropyléther.

Rendement : 27 g = 71 %.

Point de fusion : 83-84°.

Analyse

	TAUX CALCULÉS	TAUX TROUVÉS
C.....	52,63 %	52,49 %
H.....	5,70 %	5,61 %
P.....	13,59 %	13,49 %

Le spectre infrarouge du produit ne montre plus de bande OH.

Lors des premiers essais pour la préparation de ce produit, après avoir chassé la pyridine, nous avons repris le résidu avec de l'éther, lavé cette solution avec de l'eau, de l'acide sulfurique à 1 % et ensuite avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. Après distillation de l'éther il restait une huile légèrement jaune que nous avons distillée sous vide. La fraction principale passait à 131-133° (0,02 mmHg). Cette huile avait un indice de réfraction $n_D = 1{,}5118$ à 23°. Ce produit a cristallisé spontanément après plusieurs semaines.

2° Préparation du butanediol-1,3-(hydrogène phosphate).

9,2 g de butanediol-1,3-(phényl-phosphate) dissous dans 400 ml de méthanol anhydre sont hydrogénés en présence de 450 mg d'oxyde de platine. Lorsque la réaction est terminée (4 l H_2 absorbés; calculé 3,6 l), on filtre la solution, puis on la neutralise par addition d'environ 100 ml de baryte saturée. On concentre la solution sous vide puis on précipite le sel de baryum du butanediol-1,3-phosphate avec de l'acétone. On obtient d'abord une huile très visqueuse : en la triturant et en changeant plusieurs fois l'acétone, celle-là se transforme en un précipité poudreux que l'on essore facilement. On le sèche à 50° sous vide sur du P_2O_5.

Rendement : 8,3 g (non-hydraté) = 94,5 %.

Point de fusion : 230°. déc.

Analyse

	TAUX CALCULÉS	TAUX TROUVÉS
C.....	20,21 %	20,60 %
H.....	4,20 %	4,17 %
P.....	13,05 %	13,05 %

Spectres IR :

— bandes fortes à 805, 885, 940, 1 160 et 2 960 cm^{-1};
— bandes très fortes à 1 075, 1 230 cm^{-1};
— bandes faibles à 750, 845, 965, 985 et 1 385 cm^{-1}.

1,8 MESURES CONDUCTIMÉTRIQUES SUR LA COMPLEXATION DES PHOSPHATES CYCLIQUES

Les sels de cyclohexylammonium de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate et du butanediol-1,3-phosphate ont été titrés avec différentes bases dans des conditions de température et de concentration bien définies, et leurs conductibilités, contrôlées à chaque addition de base ou de sel (pour les mesures à pH 7).

Pour ne pas trop diluer la solution du phosphate à titrer par l'addition de la solution contenant le cation, le rapport des concentrations des deux est pris le plus grand possible. Dans nos mesures il est de 1:10-1:20. La correction de volume a cependant toujours été faite, en multipliant les valeurs mesurées des résistances par le facteur de dilution ($N/N + n$), avant de les transformer en leurs inverses, les conductibilités.

La température joue un rôle très important en conductimétrie et nous l'avons par conséquent tenue rigoureusement constante. Avant chaque mesure nous avons équilibré la température de la cellule pendant 15 mn au moins.

Les concentrations des solutions à titrer ont été choisies de façon à ne pas donner des conductibilités trop grandes, puisque les mesures deviennent moins exactes lorsque la résistance de la solution diminue.

Comme le montrent les courbes de titrage obtenues, ces conditions sont bien remplies.

1,81 Titrage de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) avec du $BaBr_2$.

Une solution 0,05 M d'α-méthylglucoside-4,6-phosphate a été titrée par une solution 1 M de bromure de baryum.

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés	FACTEUR de correction ($N/N + n$)
	mesurés	corrigés		
0	164,2	—	$6,09 \cdot 10^{-3}$	—
0,3	58,0	56,86	$1,76 \cdot 10^{-2}$	0,9804
0,5	41,0	39,68	$2,52 \cdot 10^{-2}$	0,9677
0,6	35,8	34,42	$2,91 \cdot 10^{-2}$	0,9615
0,7	31,8	30,38	$3,29 \cdot 10^{-2}$	0,9554
0,8	28,8	27,34	$3,66 \cdot 10^{-2}$	0,9494
0,9	26,3	24,81	$4,03 \cdot 10^{-2}$	0,9434
1,0	24,3	22,78	$4,39 \cdot 10^{-2}$	0,9375
1,1	22,6	21,06	$4,75 \cdot 10^{-2}$	0,9317
1,3	20,0	18,40	$5,43 \cdot 10^{-2}$	0,9202
1,4	18,7	17,10	$5,86 \cdot 10^{-2}$	0,9146
1,5	17,8	16,18	$6,18 \cdot 10^{-2}$	0,9091
1,6	16,9	15,27	$6,55 \cdot 10^{-2}$	0,9036
1,7	16,1	14,46	$6,92 \cdot 10^{-2}$	0,8982
1,8	15,4	13,75	$7,27 \cdot 10^{-2}$	0,8929

La rupture de pente de la courbe se fait exactement au point d'équivalence pour un complexe 1/1, pour un volume d75 ml (*fig.*e sel ajouté de 0, 8).

1,82 **Titrage du Butandiol-1,3-phosphate avec le $BaBr_2$.**

15 ml d'une solution 0,04 M du sel de cyclohexylammonium du phosphate cyclique ont été titrés avec une solution 1 M de bromure de baryum.

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés	FACTEUR de correction (N/N + *n*)
	mesurés	corrigés		
0	106,4	—	$0,95 \cdot 10^{-3}$	
0,2	58,9	58,12	$1,70 \cdot 10^{-2}$	
0,3	48,5	47,54	$2,10 \cdot 10^{-2}$	
0,4	41,3	40,23	$2,49 \cdot 10^{-2}$	
0,5	36,0	34,84	$2,87 \cdot 10^{-2}$	
0,6	31,9	30,67	$3,26 \cdot 10^{-2}$	
0,7	28,8	27,52	$3,63 \cdot 10^{-2}$	
0,8	26,6	25,25	$3,96 \cdot 10^{-2}$	
0,9	24,5	23,11	$4,32 \cdot 10^{-2}$	
1,1	21,3	19,85	$5,04 \cdot 10^{-2}$	
1,2	20,0	18,52	$5,40 \cdot 10^{-2}$	
1,3	18,8	17,30	$5,78 \cdot 10^{-2}$	
1,4	17,8	16,28	$6,14 \cdot 10^{-2}$	
1,5	16,9	15,36	$6,51 \cdot 10^{-2}$	
1,6	16,2	14,64	$6,83 \cdot 10^{-2}$	
1,7	15,4	13,83	$7,23 \cdot 10^{-2}$	
1,8	14,8	13,22	$7,56 \cdot 10^{-2}$	
1,9	14,2	12,60	$7,94 \cdot 10^{-2}$	
2,0	13,6	12,00	$8,33 \cdot 10^{-2}$	

La rupture de pente de la courbe (*fig.* 8*a*) montre la formation d'un complexe 1/1.

1,83 **Titrage conductimétrique de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate avec le $MgCl_2$.**

15 ml d'une solution 0,05 M du sel de cyclohexylammonium ont été titrés avec une solution de chlorure de magnésium 1 M.

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés
	mesurés	corrigés	
0	168,7	—	$5{,}93 \cdot 10^{-3}$
0,2	78,1	77,1	$1{,}30 \cdot 10^{-2}$
0,3	62,1	60,88	$1{,}64 \cdot 10^{-2}$
0,4	51,8	50,45	$1{,}98 \cdot 10^{-2}$
0,5	44,5	43,06	$2{,}32 \cdot 10^{-2}$
0,6	39,0	37,5	$2{,}67 \cdot 10^{-2}$
0,7	34,8	33,25	$3{,}01 \cdot 10^{-2}$
0,8	31,5	29,9	$3{,}34 \cdot 10^{-2}$
0,9	28,8	27,17	$3{,}68 \cdot 10^{-2}$
1,0	26,6	24,95	$4{,}01 \cdot 10^{-2}$
1,1	24,8	23,11	$4{,}33 \cdot 10^{-2}$
1,2	23,2	21,48	$4{,}66 \cdot 10^{-2}$
1,3	22,0	20,24	$4{,}94 \cdot 10^{-2}$
1,4	20,7	18,93	$5{,}28 \cdot 10^{-2}$
1,5	19,65	17,86	$5{,}60 \cdot 10^{-2}$
1,6	18,7	16,90	$5{,}92 \cdot 10^{-2}$
1,7	18,0	16,17	$6{,}18 \cdot 10^{-2}$
1,8	17,1	15,27	$6{,}55 \cdot 10^{-2}$
1,9	16,4	14,56	$6{,}87 \cdot 10^{-2}$
2,0	15,8	13,94	$7{,}17 \cdot 10^{-2}$

La *figure* 9 indique qu'il s'est formé un complexe 1/1.

1,84 **Titrage conductimétrique du butanediol-1,3-phosphate avec le $MgCl_2$.**

15 ml d'une solution 0,05 M du sel de cycloxylammonium sont titrés à 25° et pH 7 avec une solution 1 M de $MgCl_2$.

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés
	mesurés	corrigés	
0	110	—	$9{,}09 \cdot 10^{-3}$
0,2	66,2	61,38	$1{,}63 \cdot 10^{-2}$
0,3	51,4	50,39	$1{,}99 \cdot 10^{-2}$
0,4	44,0	42,86	$2{,}33 \cdot 10^{-2}$
0,5	38,4	37,16	$2{,}69 \cdot 10^{-2}$
0,6	34,2	32,88	$3{,}04 \cdot 10^{-2}$
0,7	30,8	29,43	$3{,}40 \cdot 10^{-2}$
0,8	28,1	26,68	$3{,}75 \cdot 10^{-2}$
0,9	25,9	24,43	$4{,}09 \cdot 10^{-2}$
1,0	24,1	22,59	$4{,}43 \cdot 10^{-2}$
1,1	22,5	20,96	$4{,}77 \cdot 10^{-2}$
1,2	21,2	19,63	$5{,}09 \cdot 10^{-2}$
1,3	20,0	18,40	$5{,}44 \cdot 10^{-2}$
1,4	19,05	17,42	$5{,}74 \cdot 10^{-2}$
1,5	18,1	16,46	$6{,}08 \cdot 10^{-2}$
1,6	17,28	15,61	$6{,}41 \cdot 10^{-2}$
1,7	16,4	14,73	$6{,}79 \cdot 10^{-2}$
1,8	15,80	14,11	$7{,}09 \cdot 10^{-2}$
1,9	15,2	13,49	$7{,}41 \cdot 10^{-2}$
2,0	14,7	12,97	$7{,}71 \cdot 10^{-2}$

La *figure* 10 indique un complexe 1/1.

1,85 **Titrage de l'α-méthylglucoside-6-phosphate avec $MgCl_2$.**

15 ml d'α-méthylglucoside-6-phosphate (solution 0,05 M) ont été titrés avec une solution 1 M de chlorure de magnésium.

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés
	mesurés	corrigés	
0	81,4	—	$1{,}23 \cdot 10^{-2}$
0,2	60,9	60,10	$1{,}66 \cdot 10^{-2}$
0,3	53,3	52,25	$1{,}91 \cdot 10^{-2}$
0,4	47,8	46,56	$2{,}15 \cdot 10^{-2}$
0,5	44,4	43,25	$2{,}31 \cdot 10^{-2}$
0,6	38,8	37,31	$2{,}68 \cdot 10^{-2}$
0,7	36,5	34,87	$2{,}87 \cdot 10^{-2}$
0,8	32,1	30,47	$3{,}28 \cdot 10^{-2}$
0,9	29,3	27,64	$3{,}62 \cdot 10^{-2}$
1,0	27,4	25,69	$3{,}89 \cdot 10^{-2}$
1,1	25,4	23,67	$4{,}23 \cdot 10^{-2}$
1,2	23,8	22,04	$4{,}54 \cdot 10^{-2}$
1,3	22,7	20,89	$4{,}79 \cdot 10^{-2}$
1,4	21,3	19,48	$5{,}13 \cdot 10^{-2}$
1,5	20,3	18,46	$5{,}42 \cdot 10^{-2}$
1,6	19,7	17,80	$5{,}62 \cdot 10^{-2}$
1,7	18,7	16,80	$5{,}95 \cdot 10^{-2}$
1,8	18,1	16,16	$6{,}19 \cdot 10^{-2}$
1,9	17,0	15,09	$6{,}63 \cdot 10^{-2}$
2,0	16,4	14,47	$6{,}91 \cdot 10^{-2}$
2,2	15,5	13,52	$7{,}40 \cdot 10^{-2}$
2,4	14,3	12,33	$8{,}11 \cdot 10^{-2}$
2,6	13,55	11,55	$8{,}66 \cdot 10^{-2}$

L'allure de la courbe est mise en évidence par la *figure* 11.

1,86 **Titrage de l'α-méthylglucoside-4,6-phosphate avec le KCl.**

15 ml d'une solution 0,05 M d'α-méthylglucoside-4,6-phosphate ont été titrés avec une solution 1 M de KCl.

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés
	mesurés	corrigés	
0	194,7	—	$5{,}14 \cdot 10^{-3}$
0,2	100,2	98,88	$1{,}01 \cdot 10^{-2}$
0,3	80,8	79,21	$1{,}26 \cdot 10^{-2}$
0,4	67,7	65,94	$1{,}52 \cdot 10^{-2}$
0,5	58,35	56,47	$1{,}77 \cdot 10^{-2}$
0,6	51,3	49,33	$2{,}03 \cdot 10^{-2}$
0,7	45,9	43,85	$2{,}28 \cdot 10^{-2}$
0,8	41,5	39,40	$2{,}54 \cdot 10^{-2}$
0,9	37,8	35,66	$2{,}80 \cdot 10^{-2}$
1,0	34,8	32,63	$3{,}06 \cdot 10^{-2}$
1,1	32,4	30,19	$3{,}31 \cdot 10^{-2}$
1,2	30,3	28,06	$3{,}56 \cdot 10^{-2}$
1,3	28,5	26,23	$3{,}81 \cdot 10^{-2}$
1,4	26,9	24,60	$4{,}06 \cdot 10^{-2}$
1,5	25,4	23,09	$4{,}33 \cdot 10^{-2}$
1,6	24,2	21,87	$4{,}57 \cdot 10^{-2}$
1,7	23,0	20,66	$4{,}84 \cdot 10^{-2}$
1,8	22,0	19,64	$5{,}09 \cdot 10^{-2}$
1,9	21,0	18,64	$5{,}36 \cdot 10^{-2}$
2,0	20,2	17,82	$5{,}61 \cdot 10^{-2}$

La courbe de titrage (*fig.* 12) est rigoureusement une droite.

1,87 **Titrage de l'α-méthyl-2,3-di-O-dibenzyl-glucoside-4,6-phosphate par la baryte.**

Une solution 0,02 M du phosphate cyclique a été titrée avec une solution de baryte 0,2 M (0,383 N).

MILLILITRES ajoutés	R (Ω)		kappa (mhos) corrigés
	mesurés	corrigés	
0	399,9	—	$2{,}50 \cdot 10^{-3}$
0,2	347	342,4	$2{,}92 \cdot 10^{-3}$
0,3	323,1	316,7	$3{,}16 \cdot 10^{-3}$
0,4	298,7	290,9	$3{,}44 \cdot 10^{-3}$
0,5	275,7	266,8	$3{,}75 \cdot 10^{-3}$
0,6	248,7	239,1	$4{,}18 \cdot 10^{-3}$
0,7	221,5	211,6	$4{,}73 \cdot 10^{-3}$
0,8	193,0	183,2	$5{,}46 \cdot 10^{-3}$
0,9	165,5	156,1	$6{,}41 \cdot 10^{-3}$
1,0	142,7	133,8	$7{,}47 \cdot 10^{-3}$
1,1	123,2	114,8	$8{,}71 \cdot 10^{-3}$
1,2	108,7	104	$9{,}94 \cdot 10^{-3}$
1,3	96,7	88,98	$11{,}24 \cdot 10^{-3}$
1,4	87,2	79,75	$12{,}54 \cdot 10^{-3}$
1,5	81,1 ?	73,73	$13{,}56 \cdot 10^{-3}$
1,6	72,9	65,87	$15{,}18 \cdot 10^{-3}$
1,8	63,6	56,79	$17{,}61 \cdot 10^{-3}$
2,0	54,9	48,44	$20{,}64 \cdot 10^{-3}$
2,5	41,9	35,92	$27{,}84 \cdot 10^{-3}$
3,0	33,8	28,17	$35{,}50 \cdot 10^{-3}$

La *figure* 13 montre l'allure de la courbe de titrage.

1,9 **Détermination de la vitesse d'hydrolyse d'un phosphate cyclique par la méthode conductimétrique.**

On prépare une solution de 160,5 mg de méthyl-2,3-di-O-benzyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate (sel de cyclohexylammonium) dans 15 ml de baryte 0,02 N. Cette solution est 0,02 M en sucre.

Cette solution a été placée dans un ultra-thermostat à 85,1° puis nous avons mesuré la conductivité de la solution à des intervalles de temps différents.

La constante de vitesse de la réaction a été calculée selon la formule suivante :

$$k_2 = \frac{1}{a \cdot t} \cdot \frac{x}{1 - x},$$

où :

a = quantité initiale de substrat;
t = temps;
$x = \dfrac{\text{kappa (O)-kappa (t),}}{\text{kappa (t)-kappa (infini)}}$ où kappa = conductibilité.

Le tableau suivant résumera les valeurs obtenues :

TEMPS	R (mes.)	kappa (mes.)	$\frac{1}{a \cdot t}$	x	$1 - x$	$\frac{x}{1 - x}$	k_2
(mn.)	Ω	(mhos)					(l. mole^{-1} mn^{-1}) ($\times 10^{-2}$)
0	71,0	1,4084	—	—	—	—	—
15	71,2	1,4045	3,33	0,0314	0,9686	0,0328	1,09
135	72,2	1,3850	0,37	0,224	0,9776	0,229	0,846
165	72,5	1,3793	0,315	0,294	0,9706	0,303	0,955
195	72,6	1,3774	0,256	0,320	0,9680	0,331	0,847
229	72,8	1.3736	0,218	0,374	0,9626	0,388	0,846
255	72,95	1,3708	0,196	0,416	0,9584	0,434	0.851
285	73,1	1,3680	0,175	0,462	0,9538	0,484	0,847
infini	78,1	1,2804	—	—	—	—	—

La moyenne pour $k_2 = 0{,}896 \cdot 10^{-2}$ (l.mole^{-1}.mn^{-1}).

BIBLIOGRAPHIE

[1] M. Berthelot. — *Ann. Chim.* (France), **54**, 81 (1858).
[2] J. Cavalier. — *Ann. Chim.* (7), **18**, 482 (1899).
[3] W. Lossen et W. Kohler. — *Ann. Chem. u. Pharm.*, t. CCLXII, p. 195 (1891).
[4] F. Malengraú et F. Prigent. — *Z. Physiol. Chem.*, **75**, 68 (1911).
[5] M. C. Bailly. — *Bull. Soc. Chim.* (France), 314, 340, 405, 421 (1942).
[6] A. Desjobert. — *C. R. Acad. Sci.*, **224**, 575 (1942).
[7] A. Desjobert. — *Bull. Soc. Chim.* (France), 809 (1947).
[8] W. W. Butcher et F. H. Westheimer. — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2420 (1955).
[9] C.A. Vernon. — *Phosphoric esters and related compounds*, Special publications, n° 8, p. 17, The Chemical Society, London (1957).
[10] C. A. Vernon, K. G. Oldham, C. A. Bunton et D. R. Llewellyn. — *J. Chem. Soc.* 3574 (1958).
[11] F. Lipmann. — *Proc Nat. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 1194 (1960).
[12] R. P. Linstead, L. N. Owens et R. F. Webb. — *J. Chem. Soc.*, 1211 (1953).
[13] C. K. Ingold. — Chap. viii, *Structure and mechanism in organic chemistry*, G. Bell and Sons, Ltd. (1953).
[14] A. Lapidot, D. Samuel et B. Silver. — *Chem. Ind.* (London), 468 (1963).
[15] E. Cherbuliez, H. Dahn, H. Moll, H. Probst et J. Rabinowitz. — *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1075 (1962).
[16] E. Cherbuliez et J. Rabinowitz. — *Helv. Chim. Acta*, **39**, 1844 (1956).
[17] J. F. Bunnett. — *Ang. Chem. Intern. Ed. Engl.*, **1**, 225 (1962).
[18] D. M. Brown, M. Fried et A. R. Todd. — *J. Chem. Soc.*, 2206 (1955).
[19] D. M. Brown, F. Hayes et A. R. Todd. — *Ber.* **90**, 936 (1957).
[20] O. Meyerhof et K. Lohmann. — *Biochem. Z.*, **271**, 89 (1934).
[21] M. Halmann, A. Lapidot et D. Samuel. — *J. Chem. Soc.*, 1944 (1962).
[22] R. H. A. Plimmer et W. J. N. Burch. — *J. Chem. Soc.*, 279, 292 (1929).
[23] C. A. Vernon, M. M. Mhala, K. G. Oldham et C. A. Bunton. — *J. Chem. Soc.*, 3293 (1960).
[24] F. H. Westheimer, W. W. Butcher et J. Kumamoto. — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2515 (1955).
[25] E. Blumenthal et J. B. M. Herbert. — *Trans. Faraday Soc.*, **41**, 611 (1945).
[26] G. M. Kosolapoff. — *Organo-phosphorous compounds*, p. 232, J. Wiley (N. Y.) (1950).
[27] J. R. Van Wazer et K. A. Holst. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 639 (1950).
[28] W. N. Aldridge. — *Biochem.* J., **53**, 117 (1953).
[29] A. R. Main. — *Biochem. J.*, **74**, 10 (1960).
[30] W. N. Aldridge. — *Biochem. J.*, **53**, 185 (1952).
[31] I. H. Heller et S. Hesse. — *Exptl. Neurol.*, **1**, 125 (1959).
[32] W. N. Aldridge et A. N. Davison. — *Biochem. J.*, **52**, 663 (1952).
[33] A. Fono. — *Arkiv. för Kemi, Mineralogi och Geologi*, **24 A**, n° 33, 14 (1947).
[34] D. M. Brown et D. A. Usher. — *Proc. Chem. Soc.*, 309 (1963).
[35] D. M. Brown et N. K. Hamer. — *J. Chem. Soc.*, 406 (1960).
[36] E. Chargaff. — *J. Biol. Chem.*, **144**, 455 (1942).

[37] E. Baer et M. Kates. — *J. Biol. Chem.*, **175**, 79 (1948).
[38] M. C. Bailly. — *C. R. Acad. Sci.*, **208**, 443, 1820 (1939).
[39] P. E. Verkade, J. C. Stoppelenburg et W. D. Cohen. — *Rec. Trav. Chim.*, **59**, 886 (1940).
[40] D. M. Brown et H. M. Higson. — *J. Chem. Soc.*, 2034 (1957).
[41] D. M. Brown, D. I. Magrath, A. H. Neilson et A. R. Todd. — *Nature*, **177**, 1124 (1956).
[42] O. Bailly et J. Gaume. — *Bull. Soc. Chim.* (France), **2**, 354 (1935).
[43] E. Fischer. — *Ber.*, **53**, 1621 (1920).
[44] D. M. Brown, G. E. Hall et H. M. Higson. — *J. Chem. Soc.*, 1360 (1958).
[45] D. M. Brown, G. E. Hall et R. Letters. — *J. Chem. Soc.*, 3547 (1959).
[46] D. M. Brown et G. E. Hall. — *J. Chem. Soc.*, 357 (1959).
[47] J. Lecocq, P. Fleury et L. Le Dizet. — *Bull. Soc. Chim.* (France), 1193 (1956).
[48] C. Long et M. F. Maguire. — *Biochem. J.*, **54**, 612 (1953).
[49] E. Baer et M. Kates. — *J. Biol. Chem.*, **185**, 615 (1950).
[50] H. S. Forrest et A. R. Todd. — *J. Chem Soc.*, 3295 (1950).
[51] A. C. Paladini et L. F. Leloir. — *Biochem. J.*, **51**, 426 (1952).
[52] J. Baddiley et E. M. Thain. — *J. Chem. Soc.*, 3783 (1952).
[53] D. M. Brown et A. R. Todd. — *J. Chem. Soc*,. 52, (1952).
[54] R. Markham et J. D. Smith. — *Biochem. J.*, **52**, 552 (1952).
[55] D. Lipkin, P. T. Talbert et M. Cohn. — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2871 (1954).
[56] D. E. Jordan. — *Ann. Rev. Biochem.*, **21**, 209 (1952).
[57] D. Lipkin et J. S. Dixon. — *Science*, **116**, 525 (1952).
[58] D. Lipkin et P. T. Talbert. — *Chem. Ind.* (London), 143 (1955).
[59] A. Hock et G. Huber. — *Biochem. Z.*, **328**, 44 (1956).
[60] D. Lipkin, R. Markham et W. H. Cook. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6075 (1959).
[61] D. Lipkin, R. Markham et W. H. Cook. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6198 (1959).
[62] T. W. Rall et E. W. Sutherland. — *J. Biol. Chem.*, **232**, 1065 (1958).
[63] R. C. Haynes jr. — *J. Biol. Chem.*, **233**, 1220 (1958).
[64] J. V. Passoneau et O. H. Lowry. — *Federation Proc.*, **21**, 87 (1962).
[65] T. E. Mansour et J. M. Mansour. — *J. Biol. Chem.*, **273**, 629 (1962).
[66] L. F. Leloir. — *Progress in the chemistry of organic natural products*, L. Zechmeister, editor, vol. 8, p. 59, Springer Verlag, Wien (1951).
[67] K. Lohmann. — *Biochem. Z.*, **194**, 306 (1928).
[68] A. Desjobert. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 42 (1951).
[69] M. Cohn. — *J. Biol. Chem.*, **180**, 771 (1949).
[70] M. L. Bender. — *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1626 (1951).
[71] C. A. Bunton, B. L. Silver et C. A. Vernon. — *Proc. Chem. Soc.*, 348 (1957).
[72] A. S. Couper. — C. R. Acad. Sci., **46**, 1157 (1858).
[73] A. Michaelis et W. Kerkhof. — Ber., **31**, 2172 (1898).
[74] A. Arbuzow, V. M. Zoroastrova et N. I. Rizpolojenski. — *Bull. Akad. Nauk* (U.R.S.S.), *otdel. khim. nauk*, 208 (1948).
[75] S. O. Grim et R. Schaaf. — *Ang. Chem.*, **75**, 669 (1963).
[76] J. Goubeau et W. Wilbonn. — *Ang. Chem.*, **75**, 480 (1963).
[77] P. A. Rossiiskaya et M. I. Kabachnik. — *Bull. Akad. Nauk* (U.R.S.S.), 509 (1947).
[78] F. L. Pizer et C. E. Ballou. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 915 (1959).
[79] G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham et E. H. Pol. — *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6223 (1958).
[80] A. Streitwieser jr. — *Chem. Rev.*, **56**, 666-670 (1956).
[81] J. D. Roberts et V. C. Chambers. — *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3176, 5034 (1951).
[82] V. Prelog. — *J. Chem. Soc.*, 420 (1950).
[83] H. C. Brown, J. H. Brewster et H. Schechter. — *J. Am Chem. Soc.*, **76**, 467 (1954).
[84] R. B. Johannson. — *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 212 (1951).
[85] H. C. Brown et M. Borkowski. — *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1894 (1952).
[86] P. C. Haake et F. H. Westheimer. — *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1102 (1961).

[87] K. S. Pitzer. — *Science*, **101**, 672 (1945).
[88] J. E. Kilpatrick, K. S. Pitzer et R. Spitzer. — *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2483 (1947).
[89] D. M. Brown, D. I. Magrath et A. R. Todd. — *J. Chem. Soc.*, 2708 (1962).
[90] H. G. Khorana et G. M. Tener. — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5349 (1955).
[91] J. G. Moffat et H. G. Khorana. — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1194 (1957).
[92] M. Smith G. I. Drummond et H. G. Khorana. — *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 698 (1961).
[93] R. L. McConnel et H. W. Coover, jr. — *J. org. Chem.*, **24**, 630 (1959).
[94] R. S. Edmundson et A. J. Lambie. — *Chem. Ind.* (London), 1048 (1959).
[95] K. Dimroth et R. Ploch. — *Ber.* **90**, 801 (1957).
[96] F. H. Westheimer, J. Kumamoto et J. R. Cox. — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4858 (1956).
[97] H. G. Khorana, G. M. Tener, R. S. Wright et J. G. Moffat. — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 430 (1957).
[98] R. E. Wall. — *Thèse* à Harvard (1960).
[99] E. T. Kaiser, M. Panar et F. H. Westheimer. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 602 (1963).
[100] F. Covitz et F. H. Westheimer. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1773 (1963).
[101] J. R. Cox jr., R. E. Wall et F. H. Westheimer. — *Chem. Ind.* (London), 929 (1959).
[102] F. Ramirez, R. B. Mitra et N. B. Desai. — *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2652 (1960).
[103] F. Ramirez, N. B. Desai et N. Ramanathan. — *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1317 (1962).
[104] F. Ramirez, B. Hansen et N. B. Desai. — *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4588 (1962).
[105] F. Ramirez, N. B. Desai et N. Ramanathan. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1874 (1963).
[106] F. Ramirez, O. P. Madau et N. B. Desai. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2681 (1963).
[107] F. Ramirez, A. W. Pathwardan, N. B. Desai, N. Ramanathan et C. V. Greco. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3056 (1963).
[108] F. Ramirez et N. B. Desai. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3252 (1963).
[109] A.F. Turner et H. G. Khorana. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4651 (1959).
[110] J. Baddiley et E. M. Thain. — *J. Chem. Soc.*, 3783 (1952).
[111] J. Baddiley, J. G. Buchanan et L. Szabo. — *J. Chem. Soc.*, 3826 (1954).
[112] P. Szabo et L. Szabo. — *J. Chem. Soc.*, 448 (1961).
[113] P. Szabo et L. Szabo. — *J. Chem. Soc.*, 3758 (1960).
[114] A. O. Nier. — *Phys. Revs.*, **77**, 789 (1950).
[115] D. Samuel et F. Steckel. — *Intern. J. Appl. Radiation Isotop.* **11**, 190 (1961).
[116] D. Samuel. — *Methodology of Oxygen Isotopes* in *Oxygenases* (ed. O. Hayaishi), Acad. Press (N. Y.) (1962).
[117] I. Dostrovsky et D. Samuel. — *Syntheses with isotopes of oxygen* in *Inorganic isotopic syntheses* (ed. R. H. Herber), W. Benjamin et Co., (N. Y.) (1962).
[118] H. Dahn. — *Bull. Soc. Chim.* (France), 1875 (1960).
[119] M. D. Kamen. — *Isotopic tracers in biology*, p. 339, Acad. Press (N. Y.), (1957).
[120] T. Titani et K. Goto. — *Bull. Chem. Soc.* (Japan), **14**, 77 (1939).
[121] E. R. S. Winter, H. V. A. Briscoe et M. Carlton. — *J. Chem. Soc.*, 131 (1940).
[122] G. Schramm et O. Armbruster. — *Z. Naturforsch.*, **9 b**, 114 (1954).
[123] J. Roche et S. Bouchilloux. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 732 (1950).
[124] S. S. Stein et D. E. Koshland. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 229 (1952).
[125] P. C. Haake. — *Thèse*, à l'Université de Harvard (1960).
[126] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers et Fred Smith. — *Anal. Chem.*, **28**, 351 (1956).
[127] I. Dostrovsky et F. S. Klein. — *Anal. Chem.*, **24**, 414 (1952).
[128] P. D. Boyer, D. J. Graves, C. H. Smelter et M. E. Dempsey. — *Anal. Chem.*, **33**, 1906 (1961).
[129] M. Anbar, M. Halmann et B. L. Silver. — *Anal. Chem.*, **32**, 841 (1960).
[130] H. Dahn, H. Moll et R. Menasse. — *Helv. Chim. Acta*, **42**, 1225 (1959).
[131] M. Anbar et S. Guttmann. — *Int. J. Appl. Radiation Isotop.*, **4**, 233 (1959). Voir aussi : D. Samuel. — *J. Chem. Soc.*, 1318 (1960).
[132] M. Anbar. — *Intern. J. Appl. Radiation Isotop.*, **3**, 131 (1958).

[133] F. R. Williams et L. P. Hager. — *Science*, **128**, 1434 (1958).
[134] D. Rittenberg et L. Pontecorvo. — *Intern. J. Appl. Radiation Isotop.*, **1**, 208 (1956).
[135] M. Anbar, I. Dostrovsky, F. S. Klein et D. Samuel. — *J. Chem. Soc.*, 155 (1955).
[136] W. V. E. Doering et E. Dorfman. — *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5595 (1953).
[137] A. B. Falcone. — *Anal. Biochem.*, **2**, 147 (1961).
[138] J. S. Lee. — *Anal. Chem.*, **34**, 835 (1962).
[139] D. E. Koshland et al. — *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 105 (1958).
[140] I. Fogelstrom-Fineman, O. Holm-Hansen, B. M. Tolbert et M. Calvin. — *Intern. J. Appl. Radiation Isotop.*, **2**, 280 (1957).
[141] A. Fleckenstein, E. Gerlach, J. Janke et P. Marmier. — *Pflügers Arch. ges. Phys.*, **271**, 74 (1960).
[142] B. A. Thompson. — *Anal. Chem.*, **33**, 583 (1961).
[143] S. Amiel et Max Peisach. — *Anal. Chem.*, **35**, 3, 323 (1963).
[144] M. Halmann et S. Pinchas. — *J. Chem. Soc.*, 1703 (1958).
[145] S. R. Polo et M. K. Wilson. — *J. Chem. Phys.*, **22**, 900 (1954).
[146] J. .G Karabatsos. — *J. Org. Chem.*, **25**, 315 (1960).
[147] M. Anbar, M. Halmann et S. Pinchas. — *J. Chem. Soc.*, 1242 (1960).
[148] S. Pinchas et M. Halmann. — *J. Chem Soc.*, 1246 (1960).
[149] B. Spencer. — *Biochem. Z.*, **71**, 198 (1959).
[150] M. Halmann et S. Pinchas. — *J. Chem. Soc.*, 3264 (1958).
[151] S. Pinchas, D. Samuel et M. Weiss-Broday. — *J. Chem. Soc.*, 1688, 2666, 2382, 3063 (1961).
[152] A. Lapidot, S. Pinchas et D. Samuel. — *Proc. Chem. Soc.*, 109 (1962).
[153] A. W. Baker. — *J. Phys. Chem.*, **61**, 450 (1957).
[154] G. Duyckaerts. — *Analyst*, **84**, 201 (1959).
[155] A. Tolk. — *Spectrochim. Acta*, **17**, 511 (1961).
[156] D. M. Brown et G.E. Hall. — *J. Chem. Soc.*, 357 (1959).
[157] D. E. C. Corbridge et E. J. Lowe. — *J. Chem. Soc.*, 493 (1954).
[158] P. Rivaille. — *Thèse*, Faculté des Sciences (Paris) (1962).
[159] E. M. Montgomery, N. K. Richtmeyr et C. S. Hudson. — *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 3 (1943).
[160] C. M. McCloskey et G. H. Coleman. — *J. Org. Chem.*, **10**, 184 (1945).
[161] M. Machebœuf et J. L. Delsal. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **25**, 116 (1943).
[162] C. Neuberg et I. Mandl. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **23**, 499 (1949).
[163] C. Neuberg et I. S. Roberts. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **20**, 185 (1949).
[164] A. L. Lehninger. — *Physiol. Rev.*, **30**, 493 (1950).
[165] F. T. Wall, H. Terayama et S. Techamkumpuch. — *J. Polym. Sci.*, **20**, 477 (1956).
[166] E. Thilo. — *Ang. Chem.*, **67**, 141 (1955).
[167] H. S. Frank et M. W. Evans. — *J. Chem. Phys.*, **13**, 507 (1945).
[168] M. Evans et N. Uri. — *S.E.B. Symposium*, n° 5 (Cambridge) (1951).
[169] R. J. P. Williams. — *J. Phys. Chem.*, **58**, 121 (1954).
[170] G. H. Nancollas. — *J. Chem. Soc.*, 744 (1956).
[171] C. W. Davies et C. B. Monk. — *J. Chem. Soc.*, 413, 427 (1949).
[172] E. Cherbuliez, J. P. Leber et P. Stucki. — *Helv. Chim. Acta*, **36**, 537 (1953).
[173] H. G. Hers. — *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 424 (1952).
[174] E. Bamann et M. Meisenheimer. — *Ber*, **71**, 1711 (1938).
[175] E. Bamann et E. Nowotny. — *Chem. Ber.*, **81**, 451, 455 (1958).
[176] H. N. Stokes. — *Am. Chem J.*, **15**, 198 (1893) et **16**, 123 (1894).
[177] L. Anschutz et W. Broeker. — *Ber.*, **59**, 2848 (1926).
[178] E. Bamann, J. Riehl et R. Nicolai. — *Biochem. Z.*, **328**, 12 (1956).
[179] E. Bamann et H. Trapmann. — *Adv. in Enzymology*, **21**, 169 (1959).
[180] E. Bamann et W. D. Muetterlein. — *Ber.*, **91**, 471 (1958).
[181] T. A. Sundararajan, K. S. V. S. Kumar et P. S. Sarma. — *Biochim. Biophys. Acta*, **28**, 148 (1958).

[182] E. Bamann, H. Trapmann et A. Schuegraf. — *Chem. Ber.*, **88**, 1726 (1955).
[183] C. W. Helleiner et J. A. V. Butler. — *Can. J. Chem.*, **33**, 705 (1955).
[184] C. S. Hanes et F. A. Isherwood. — *Nature*, **164**, 1107 (1949).
[185] J. Walker. — *Proc. Roy. Soc.*, 79A, 157 (1906).
[186] D. A. McInnes. — *Principles of Electrochemistry*, p. 378, Reinhold Publishing Co, 1939.
[187] G. Jander et H. Immig. — *Ber.* **69 A**, 1282 (1936).
[188] C. W. Davies. — *J. Chem. Soc.*, 1256 (1951).
[189] H. Kilde. — *Z. anorg. Chem.*, **218**, 113 (1934).
[190] D. I. Stock et C. W. Davies. — *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 856 (1948).
[191] R. P. Bell et J. E. Prue. — *J. Chem. Soc.*, 362 (1949).
[192] C. W. Davies et G. M. Waind. — *J. Chem. Soc.*, 301 (1950).
[193] C. W. Davies. — *J. Chem. Soc.*, 349 (1939).
[194] H. S. Harned et C. M. Mason. — *J. Am. Chem. Soc.*, **54**, 1441 (1932).
[195] E. Pfeil. — *Chem. Ber.*, **84**, 229 (1951).
[196] O. Loew. — *Chem. Ber.*, **21**, 27 (1888).
[197] M. Martland et R. Robison. — *Biochem. J.*, **21**, 665 (1927).
[198] G. E. Delory et E. J. King. — *Biochem. J.*, **37**, 547 (1943).
[199] R. J. P. Williams. — *J. Chem. Soc.*, 3770 (1952).
[200] M. Calvin et A. E. Martell. — *The chelation*, Prentice-Hall, Inc. (New York) (1952).
[201] L. J. Bellamy, *The IR-spectra of complex molecules*, p. 312, Methuen et Cie (London) (1958).
[202] J. R. Van Wazer et D. A. Campanella. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 655 (1950).
[203] R. M. Fuoss et C. A. Kraus. — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3304 (1957).
[204] J. M. Smithson et R. J. P. Williams. — *J. Chem. Soc.*, 457 (1958).
[205] G. H. Nancollas. — *Quarterly Rev.*, **14**, 402 (1960).
[206] H. Brintzinger. — *Helv. Chim. Acta*, **44**, 935 (1961).
[207] H. Brintzinger. — *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1199 (1961).
[208] J. W. Baker et D. M. Easty. — *J. Chem. Soc.*, 1193 (1952).
[209] S. J. Cristol, B. Franzus et A. Shadan. — *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2513 (1955).
[210] J. Lauder, I. R. Wilson et B. Zerner. — *Austral. J. Chem.*, **14**, 41 (1961).
[211] C. A. Bunton et Y. F. Frei. — *J. Chem. Soc.*, 1872 (1951).
[212] C. A. Bunton et V. A. Welch. — *J. Chem. Soc.*, 3240 (1956).
[213] J. S. Brimacombe, A. B. Foster, E. B. Hancock, W. G. Overend et M. Stacey. — *J. Chem. Soc.*, 201 (1960).
[214] C. Gardiner Swain, R. M. Esteve jr., et R. H. Jones. — *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 965 (1949).
[215] L. H. Sommer, O. F. Bennett, P. G. Campbell et D. R. Weyenberg. — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3295 (1957). et Sommer et Bunnet, *ibid.*, 1008.
[216] L. H. Sommer et C. L. Frye. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1013 (1959).
[217] L. H. Sommer. — *Angew. Chem.*, **74**, 176 (1962).
[218] R. West et J. Y. Corey. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 4030 (1963).
[219] J. R. Van Wazer. — *Phosphorus and its compounds*, vol. I, Interscience, (N. Y.) (1959).
[220] L. Pauling. — *J. Phys. Chem.*, **56**, 361 (1952).
[221] J. D. Dunitz et J. S. Rollet. — *Acta Cristal.*, **9**, 327 (1956).
[222] L. Pauling. — *The nature of the chemical bond*, 2e édition, Ithaca, p. 161 (N. Y.) (1948) ou G. W. Wheland, *Resonance in organic chemistry* p. 165 (N. Y.) (1955).
[223] D. P. Graig. — *J. Chem. Soc.*, 332 (1954).
[224] H. H. Jaffe. — *J. Phys. Chem.*, **58**, 185 (1954).
[225] H. H. Jaffe. — *J. Chem. Phys.*, **21**, 258 (1953).
[226] E. R. Lippincott et R. Schroeder. — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5171 (1956),
[227] F. G. A. Stone et D. Seyferth. — *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1**, 112 (1955).
[228] L. Pauling. — *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 1367 (1931).
[229] W. Huckel. — *Ann.* **540**, 274 (1939).

[230] P. Pfeiffer. — *Chem. Ber.*, **40**, 4036 (1907).
[231] W. Autenrieth et W. Meyer. — *Chem. Ber.*, **58**, 840 (1925).
[232] R. Anschutz et W. O. Emery. — *Ann.* **239**, 312 (1887), **253**, 112 (1889).
[233] H. Gross et J. Gloede. — *Chem. Ber.*, **96**, 1387 (1963).
[234] H. Gross et J. Gloede. — *Nachr. aus Chem. u. Technik*, **11**, 358 (1963).
[235] G. Wittig et M. Rieber. — *Ann.* **562**, 187 (1949).
[236] G. Wittig et K. Clauss. — *Ann.* **577**, 26 (1952).
[237] G. Wittig et G. Geissler. — *Ann.* **580**, 44 (1953).
[238] G. Wittig et Kochdoerfer. — *Angew, Chem.*, **70**, 506 (1958).
[239] M. Green et R. Hudson. — *Proc. Chem. Soc.*, 227 (1959).
[240] D. P. Craig, A. Maccoll, R. S. Nyholm, L. E. Orgel et L. E. Sutton. — *J. Chem. Soc.* 332 (1954).
[241] M. Rouault. — *Ann. Phys.*, **14**, 78 (1940).
[242] J. K. Wilmshurst et H. J. Bernstein. — *J. Chem. Phys.*, **27**, 661 (1957).
[243] R. Mooney. — *Z. Krist.*, **98**, 377 (1938).
[244] R. C. Lord, M. A. Lynch, W. C. Schumb et E. J. Slowinski jr. — *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 522 (1950).
[245] P. J. Wheatley et G. Wittig. — *Proc. Chem. Soc.*, 251 (1962).
[246] L. Pauling et L. O. Brockway. — *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U.S.), **19**, 68 (1933).
[247] R. J. Gillespie et R. S. Nyholm. — *Quart. Rev. Chem. Soc.*, **11**, 339 (1957).
[248] J. W. Linnett et C. E. Mellish. — *Trans. Faraday Soc.*, **50**, 657, 665 (1954).
[249] R. J. Gillespie. — *Can. J. Chem.*, **38**, 818 (1960).
[250] R. J. Gillespie. — *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5978 (1960).
[251] R. J. Gillespie. — *J. Chem. Soc.*, 1002 (1952).
[252] W. Perkow, E. W. Krockow et K. Knoevenagel. — *Chem. Ber.*, **88**, 662 (1955).
[253] S. Tripett. — *Adv. Org. Chem.*, vol. 1, p. 83. Interscience (N.Y.) (1961).
[254] M. M. Schemjakin et L. D. Bergelson. — *Angew. Chem.*, **76**, 113 (1964).
[255] I. Dostrovsky et M. Halmann. — *J. Chem. Soc.*, 502 (1953).
[256] H. Eyring, J. Walter et G. E. Kimball. — *Quantum chemistry*, p. 89 J. Wiley, (1944).
[257] R. J. Gillespie. — *Can. J. Chem.*, **39**, 318 (1961).
[258] R. J. Gillespie. — *J. Chem. Soc.*, 4672 (1963).
[259] F. A. Cotton. — *J. Chem. Phys.*, **35**, 228 (1961).
[260] E. L. Mutterties, W. Mahler et R. Schmutzler. — *Inorg. Chem.*, **2**, 613 (1963).
[261] L. H. Sommer et P. G. Rodewald. — **85**, 3898 (1963).
[262] M. Viscontini, D. Hoch et P. Karrer. — *Helv. Chim. Acta*, **38**, 642 (1955).
[263] S. M. Partridge. — *Nature*, **164**, 443 (1949).
[264] P. Flodin. — *J. Chromatogr.*, **5**, 103 (1961).
[265] T. Shedlovsky. — *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 1793 (1930).

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

PHOSPHATASES ET PHOSPHODIESTÉRASES

Vu et approuvé :

Paris, le 10 novembre 1964.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

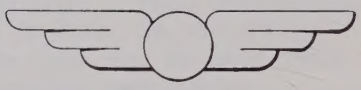
Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

SEDOCAR



IMPRIMERIE

102 461 - Imprimerie du SEDOCAR, 4, avenue de la Porte-d'Issy, Paris-XV^e
En collaboration avec l'Imprimerie FIRMIN-DIDOT (Paris)

SEDOCAR

IMPRIMERIE